

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA



1150024032



IQ

T/UNICAMP R769c

**“ CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE BIOSSENSOR
POTENCIOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE URÉIA,
COM ELETRODO ÍON-SELETIVO A AMÔNIO, USANDO
CANAVALIA BRASILIENSIS COMO FONTE ENZIMÁTICA”**

LAÉRCIO ROVER JÚNIOR

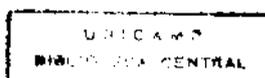
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR : PROF. DR. GRACILIANO DE OLIVEIRA NETO

CAMPINAS - 1995



02 24092
TESE R709C



CURRICULUM VITAE

1. IDENTIFICAÇÃO

NOME: Laércio Rover Júnior

NATURALIDADE: Campinas - SP

NACIONALIDADE: Brasileira

NASCIMENTO: 09 / 02 / 68

FILIAÇÃO: Laércio Rover e Élide Accioni Rover

CÉDULA DE IDENTIDADE: 17.375.465-SSP - EMISSÃO: 27/10/82

CPF - MF: 075.435.138-62

2. ESCOLARIDADE

CURSO 1.º GRAU (1.ª A 8.ª SÉRIE):
Colégio Liceu Salesiano N.S. Auxiliadora
Campinas - SP Período: 1975 a 1982

CURSO COLEGIAL OU EQUIVALENTE:
Escola Técnica Estadual Conselheiro Antônio Prado
Campinas - SP Período: 1983 a 1985
Curso: Petroquímica

CURSO SUPERIOR:
Universidade Estadual de Campinas
Cursos: 1) Bacharelado em Química Tecnológica
Período: 1986 a 1991
2) Bacharelado em Química
Período: 1992 a 1993
Campinas - SP

3. QUALIFICAÇÃO E EXPERIÊNCIA

3.1 Estágios:

- 1) Estágio no Setor de Craqueamento Catalítico de Petróleo
Entidade: Replan - PETROBRÁS SA. Período: 13/01 a 11/07/86
- 2) Estágio no Setor de Higiene e Segurança Industrial
Entidade: RHODIA SA. Período: 15/01 a 30/10/92

3.2 Cursos:

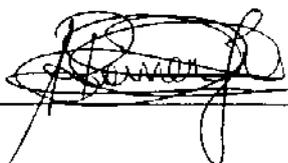
- 1) Curso de Formação de Operadores de Refinaria
Entidade: Replan - PETROBRÁS SA. Período: 2.º SEM.- 1986
- 2) Curso sobre Catálise Homogênea-Heterogênea
Entidade: UNICAMP - VIII Encontro Nacional dos Estudantes de Química - SBQ Período: 15 a 22/02/89

3.3 Publicações:

“Determinação de uréia com eletrodo íon-seletivo a amônio, utilizando *canavalia brasiliensis*”.

Neto, G.O. ; Godinho, O.E.S. ; Aleixo, L.M. ; Rover Jr., L. ; Silva, V.L. ; Montenegro, M.C.B.S.M. ; Costa Lima, J.L. .

7.º Encontro Nacional de Química Analítica - PUC - RJ
Período: 08 a 10 / 09 / 1993 - Livro de Resumos / pág. 301.



LAÉRCIO ROVER JÚNIOR

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA TESE, DEFENDIDA POR LAÉRCIO ROVER JR., E APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA.

DATA E ASSINATURA DO ORIENTADOR

Almirante Neto
22 de Março, 1995

SÍNTESE DAS ANTÍTESES

“ Só temos consciência do belo,
Quando conhecemos o feio.
Só temos consciência do bom,
Quando conhecemos o mau.
Porquanto, o Ser e o Existir
Se engendram mutuamente.
O fácil e o difícil se completam.
O grande e o pequeno são complementares.
O alto e o baixo formam um todo.
O som e o silêncio formam a harmonia.
O passado e o futuro geram o tempo.
Eis porque o sábio age pelo não-agir.
E ensina sem falar.
Aceita tudo que lhe acontece.
Produz tudo e não fica com nada.
O sábio tudo realiza - e nada considera seu.
Tudo faz - e não se apega a sua obra.
Não se prende aos frutos de sua atividade.
Termina a sua obra,
E está sempre no princípio.
E por isto sua obra prospera.”

LAO-TSÉ

(TAO TE KING)

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. Oswaldo E.S. Godinho e Fred Y. Fujiwara pelo auxílio e amizade concedidos.

Aos Profs. Drs. J.L. Costa Lima, Maria C.B.S.M. Montenegro e Valdinete L. da Silva pela colaboração e sugestões apresentadas.

Ao funcionário José D. Barbosa que muito contribuiu para o progresso deste trabalho.

Aos amigos de laboratório, pela alegria e ajuda recebidas ao longo da pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro recebido.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram com críticas e sugestões para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus pais, Laércio e Élide, pelo apoio
e incentivo dados ao longo desta jornada.

Ao Prof. Dr. Graciliano O. Neto, pela
reta-orientação e reta-compreensão
em todos os momentos, minha
sincera gratidão.

Jamais se desespere em
meio às mais sombrias aflições
de sua vida, pois das nuvens mais
cinzentas cai água límpida e fecunda!

‘ PROVÉRBIOS CHINÊS ’

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO -----	i
ABSTRACT -----	ii
CAPÍTULO I: APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS -----	01
CAPÍTULO II: URÉIA	
1.Histórico -----	04
2.Determinações de uréia -----	04
2.1 Método manométrico-----	04
2.2 Método gravimétrico -----	05
2.3 Método cromatográfico -----	05
2.4 Método espectrofotométrico -----	05
2.5 Métodos enzimáticos -----	06
2.5.1 Método condutométrico -----	06
2.5.2 Método espectrofotométrico-----	07
2.5.3 Método potenciométrico -----	08
2.5.4 Método volumétrico -----	08
CAPÍTULO III: POTENCIOMETRIA COM ELETRODOS ÍON-SELETIVOS	
1.Generalidades -----	09
2.Terminologia -----	09
2.1 Eletrodos íon-seletivos -----	09
2.2 Seletividade potenciométrica -----	14
3.Classificação dos eletrodos íon-seletivos-----	16
3.1 Eletrodos de membrana de vidro-----	16
3.2 Eletrodos baseados em sais inorgânicos -----	17
3.3 Eletrodos baseados em trocadores iônicos e suportes neutros -	18
3.4 Eletrodos sensores de gases -----	19
3.5 Miscelânea -----	20

CAPÍTULO IV: ENZIMAS

1.Introdução -----	22
2.Cinética enzimática -----	24
3.Atividade enzimática -----	27
4.Fatores que modificam a cinética enzimática -----	28
4.1 Influência da concentração de substrato -----	28
4.2 Influência da concentração de enzima -----	29
4.3 Influência de ativadores -----	29
4.4 Influência de inibidores -----	30
4.4.1 Inibição competitiva -----	31
4.4.2 Inibição não-competitiva -----	32
4.4.3 Inibição incompetitiva -----	32
4.4.4 Inibição irreversível: modificação enzimática -----	33
4.5 Influência da temperatura -----	34
4.6 Influência do pH -----	35
4.7 Influência do sistema tampão - força iônica -----	36

CAPÍTULO V: IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

1.Introdução -----	37
2.Técnicas de imobilização -----	37
2.1 Imobilização por oclusão -----	38
2.2 Imobilização por adsorção -----	38
2.3 Imobilização por ligação covalente -----	38
2.4 Imobilização por ligação covalente cruzada -----	39
2.5 Influência do uso de glutaraldeído como agente imobilizante de proteínas -----	40
3.Características das enzimas imobilizadas -----	42

CAPÍTULO VI: UREASE

1.Características gerais da urease -----	43
2.Principais fontes de urease -----	43
3.Ativadores e inibidores da urease -----	44

CAPÍTULO VII: BIOSSENSORES

1.Introdução -----	45
2.Propriedades dos biossensores potenciométricos -----	47

2.1 Estabilidade -----	47
2.1.1 Tipo de imobilização -----	47
2.1.2 Quantidade e pureza da enzima -----	47
2.1.3 Condições experimentais -----	47
2.2 Tempo de resposta -----	48
2.2.1 Velocidade de agitação -----	48
2.2.2 Concentração da enzima -----	48
2.2.3 Membrana de diálise -----	48
2.3 Sensibilidade -----	48
3. Biossensores para uréia -----	49
3.1 Revisão bibliográfica -----	50

CAPÍTULO VIII: CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DO ELETRODO ÍON-SELETIVO A AMÔNIO UTILIZANDO O IO- NÓFORO NONACTIN

1. Introdução -----	53
2. Parte experimental -----	53
2.1 Materiais e reagentes -----	53
2.2 Construção do eletrodo base -----	54
3. Resultados e discussões-avaliação do comportamento do eletrodo	55
3.1 Parâmetros de calibração -----	55
3.2 Tempo de resposta -----	56
3.3 Influência do pH -----	57
3.4 Interferência analítica -----	58
3.5 Tempo de vida -----	62

CAPÍTULO IX: CARACTERIZAÇÃO DA UREASE PROVENIENTE DA LEGUMINOSA *CANAVALIA BRASILIENSIS*

1. Introdução -----	64
2. Resultados e discussões - desempenho do sensor potenciométrico usando <i>canavalia brasiliensis</i> em suspensão como fonte enzimáti- ca para uréia -----	65
2.1 Influências do pH e do sistema tampão -----	65
2.2 Influência da quantidade de material enzimático -----	65
2.3 Influência da temperatura -----	66
2.4 Influência da concentração de enzima no tempo de resposta --	67
3. Determinação potenciométrica da atividade da urease -----	72
3.1 Determinação de K_M e $v_{m\acute{a}x}$ -----	74

CAPÍTULO X: CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSOR POTENCIOMÉ- TRICO PARA URÉIA USANDO UREASE PROVE- NIENTE DE *CANAVALIA BRASILIENSIS*

1. Introdução -----	77
2. Parte experimental -----	78
2.1 Materiais e reagentes -----	78
2.2 Confeção da membrana biossensora -----	79
2.3 Utilização de Nafion® -----	79
3. Resultados e discussões - avaliação analítica do biossensor -----	80
3.1 Parâmetros de calibração -----	80
3.2 Tempo de resposta -----	81
3.3 Membrana biossensora -----	82
3.4 Influência do uso de Nafion® na membrana biossensora -----	83
3.5 Tempo de vida -----	84
4. Determinação de uréia em amostra comercial -----	86
4.1 Método potenciométrico usando biossensor construído -----	86
4.2 Método espectrofotométrico usando reagente de Nessler -----	88
4.2.1 Procedimento experimental -----	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	91
BIBLIOGRAFIA -----	92

RESUMO

Durante os últimos anos, tem havido um grande interesse no desenvolvimento de biossensores usando novos materiais biológicos como possível alternativa para enzimas isoladas.

Neste trabalho, estudou-se primeiramente a preparação de um eletrodo seletivo a íons amônio, sem solução de referência interna, baseado no ionóforo nonactin e bis-(2-etil-hexil)-adipato como solvente plastificante, suportados numa membrana de cloreto de polivinila de massa molecular elevada.

O eletrodo exibiu resposta de 56,4 mV na faixa de concentrações de $1,0 - 1,2 \times 10^{-4}$ mol/L para íons amônio, em tampão TRIS-HCl 0,2 mol/L (pH = 6,8). Íons potássio constituem maior interferência; o tempo de resposta do eletrodo foi de 10 segundos, a 25,0 °C.

O sensor de amônio assim construído, foi usado na preparação de biossensor para determinação de uréia. O material enzimático foi obtido como pó da leguminosa *canavalia brasiliensis* , convenientemente imobilizado com glutaraldeído.

O sistema apresentou resposta de 52,9 mV na faixa de concentrações de $1,6 \times 10^{-2} - 1,1 \times 10^{-4}$ mol/L para uréia, nas mesmas condições do sensor de amônio. O tempo de resposta do biossensor foi de 10 minutos, a 30,0°C.

Os resultados experimentais mostraram que a leguminosa *canavalia brasiliensis* é uma alternativa viável em substituição à enzima isolada e purificada para fins analíticos (urease) e de desempenho superior à da *canavalia maritima*, usada anteriormente.

ABSTRACT

In recent years, there has been a great interest in development biosensors using new biological materials as possible alternative to isolated enzymes.

One of the first applications of this work was the preparation of a selective electrode for ammonium ions, without internal reference solution, based on nonactin as the ionophore and bis-(2-ethyl-hexyl)-adipate as plasticiser solvent, supported upon a high molecular weight polyvinyl chloride membrane.

The electrode exhibited a response of 56,4 mV over the range $1,0 - 1,2 \times 10^{-4}$ mol/L of ammonium ions, in TRIS-HCl 0,2 mol/L (pH= 6,8) buffer. Potassium ions constituted the greatest analytical interference; the electrode response time was 10 seconds, at 25,0°C.

The ammonium sensor as constructed, was used in the preparation of a biosensor for urea determination. The enzymatic material was the powdered bean from the leguminosae *canavalia brasiliensis* which was suitably immobilized with glutaraldehyde.

The system presented a response of 52,9 mV over the range $1,6 \times 10^{-2} - 1,1 \times 10^{-4}$ mol/L of urea, under the same conditions as the ammonium sensor. The biosensor response time was 10 minutes, at 30,0°C.

The experimental results showed that the *canavalia brasiliensis* bean is an adequate alternative to substitute enzyme isolated and purified for analytical purposes (urease) and has a superior performance to that of *canavalia maritima*, previously used.

CAPÍTULO I

APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS

Os eletrodos mais usados para as determinações de íons amônio (NH_4^+) existentes atualmente, apresentam algumas desvantagens, sobretudo tempo de resposta relativamente longo.

Desta forma, o primeiro objetivo deste trabalho foi desenvolver um eletrodo seletivo a íons amônio sem solução de preenchimento, apresentando as seguintes vantagens :

- a) facilidade de construção e manipulação;
- b) maior robustez;
- c) difusão mais regular dos íons amônio;
- d) maior velocidade de resposta e
- e) reprodutibilidade.

De acordo com Moody e Thomas [1], verificou-se que antibióticos macrotetrólitos como o nonactin [2] apresentavam grande seletividade frente ao íon de interesse, NH_4^+ , podendo ser usado em determinações potenciométricas.

Assim, construiu-se um eletrodo de membrana sólida, usando cloreto de polivinila (PVC) de massa molecular elevada como suporte para o ionóforo nonactin.

O termo ionóforo é usado para descrever ligantes que seletivamente associam-se a íons. Tipicamente, são moléculas macrocíclicas com um íon ligado numa cavidade de dimensões bem definidas. A seletividade está baseada na relação entre as dimensões do íon com o sítio ligante.

Éteres coroa constituem a classe mais conhecida de ionóforos, porém muitos outros tipos de moléculas, de ocorrência sintética ou natural, agem como ionóforos tais como metil-monesin para íons sódio e bis-(benzil-15-éter coroa-5)-heptanodoato para íons potássio, ilustrados na FIGURA I, a seguir [3].

Em química analítica, eles tem tido grande impacto no desenvolvimento de eletrodos de membrana seletiva, baseados na diferença de potencial associada à interação entre o íon de interesse com o sítio ativo do ionóforo.

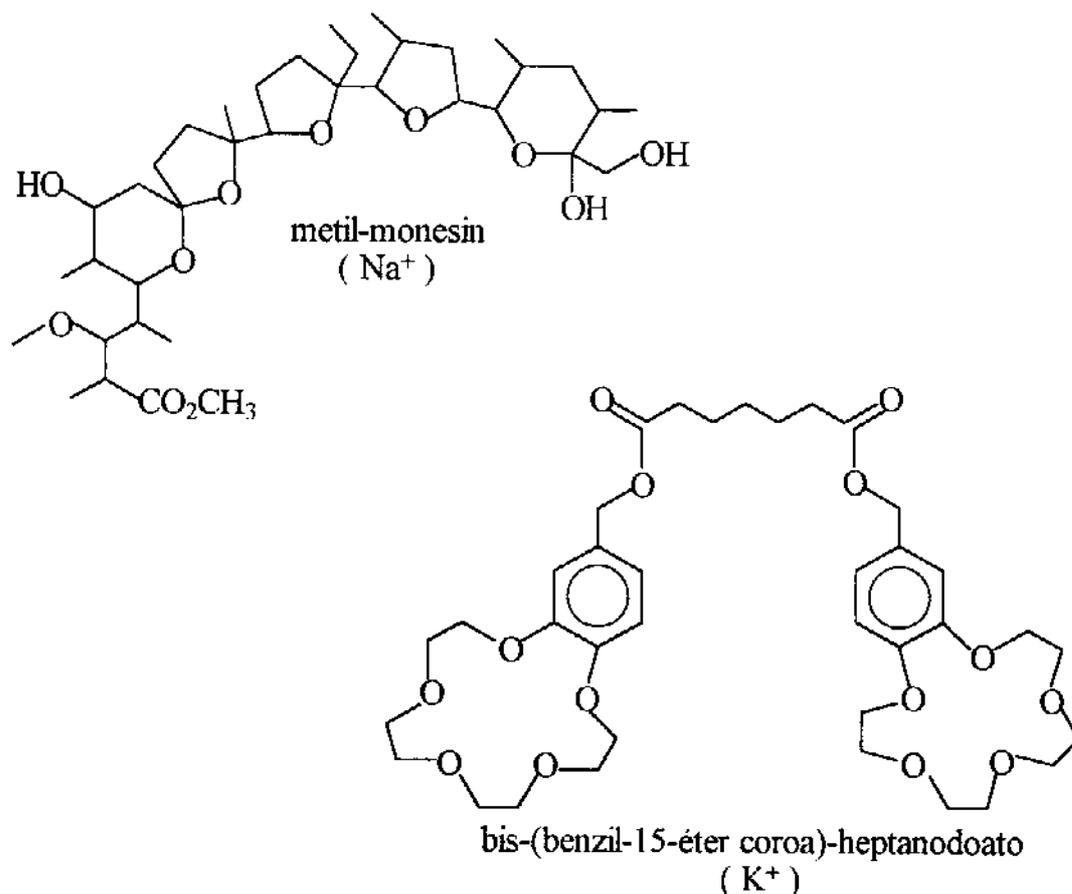


FIGURA I: Estruturas de alguns ionóforos usados para fabricação de membranas de eletrodos íon-seletivos, líquidas ou poliméricas.

Em adição à grande seletividade, ionóforos neutros usados em eletrodos íon-seletivos não estão sujeitos à protonação e, assim, tem constantes de equilíbrio para o íon ligante que não são afetadas pelo pH, como é o caso do ionóforo nonactin utilizado neste trabalho.

De todas as metodologias usadas na determinação de uréia, os métodos enzimáticos tem sido os mais desenvolvidos, por sua elevada seletividade frente ao substrato de interesse. Outro fator importante na determinação enzimática é o baixo custo por análise, quando se pensa em fontes alternativas naturais, em substituição às enzimas isoladas, que nem sempre são fáceis de se obter e com alto teor de pureza.

Assim, o segundo objetivo deste projeto foi associar a seletividade potenciométrica do eletrodo desenvolvido para íons amônio, com a seletividade enzimática para se determinar uréia, usando-se uma fonte vegetal

natural de urease : a leguminosa *canavalia brasiliensis*, devido à elevada atividade de urease presente.

Visando contribuir para o melhor entendimento do assunto desta dissertação, nos capítulos seguintes, II a VII, far-se-á uma exposição dos aspectos mais importantes relacionados com a determinação de uréia, abordando temas como: eletrodos íon-seletivos, teoria das reações envolvendo enzimas, utilização de imobilização enzimática, da enzima urease e desenvolvimento de biossensores. Nos capítulos VIII, IX e X, são apresentados os resultados experimentais obtidos, discutindo-se os pontos mais relevantes na construção do biossensor potenciométrico para uréia.

As principais unidades de concentração utilizadas neste trabalho são expressas em **mol/L**, abreviadamente **M**, estando de acordo com o Sistema Internacional de Unidades.

As figuras e tabelas apresentadas na dissertação, com as respectivas informações, foram numeradas independentemente para cada capítulo do trabalho.

CAPÍTULO II

URÉIA

1. HISTÓRICO

A uréia é um importante produto natural que constitui a etapa final do metabolismo das substâncias nitrogenadas no organismo de mamíferos sendo excretada principalmente pelos rins.

Foi descoberta por Rouelle em 1773 e sua síntese realizada por Wöhler em 1828 via cianato de amônio :



Sua determinação é um dos exames mais solicitados em laboratórios clínicos, permitindo avaliar a função renal juntamente com a determinação de creatinina.

O aumento do teor de uréia no organismo é conhecido como azotemia, podendo ter várias causas, como defeito na excreção renal, aumento na degradação de produtos proteicos, entre outros . Baixos teores de uréia podem estar associados à nutrição intravenosa ou a danos no fígado [4].

A uréia é utilizada, entre outras aplicações, como agente desnaturante de proteínas, fertilizante e como fonte de nitrogênio para ração animal. Cerca de 80 % do nitrogênio excretado pelo organismo está sob a forma de uréia.

2. DETERMINAÇÕES DE URÉIA

2.1 Método Manométrico

Este método, descrito por Van Slyke e Hiller [5], é baseado em medidas de reações que consomem ou produzem gases; é considerado muito preciso com erro de aproximadamente 1 %, porém não é usado para determinações de pequenas quantidades de uréia.

Técnicas de microdifusão de Conway [6], com modificações, possibilitaram a medida de quantidades menores, da ordem de 1 µg de nitrogênio-uréia com erro de 5 %. No entanto, estes métodos são pouco usados por serem complexos, envolvendo várias etapas reacionais.

2.2 Método Gravimétrico

Para níveis de uréia da ordem de 2,0 a 2,5 mg, o método de Fosse [7] é muito preciso, seletivo e simples, pois baseia-se na reação estequiométrica da uréia com o xantidrol, com posterior separação, secagem e pesagem do composto dixantil-uréia formado.

Os métodos gravimétricos são muito elaborados e de alto custo, porém, por sua precisão e exatidão, podem ser usados eventualmente como métodos de referência.

2.3 Método Cromatográfico

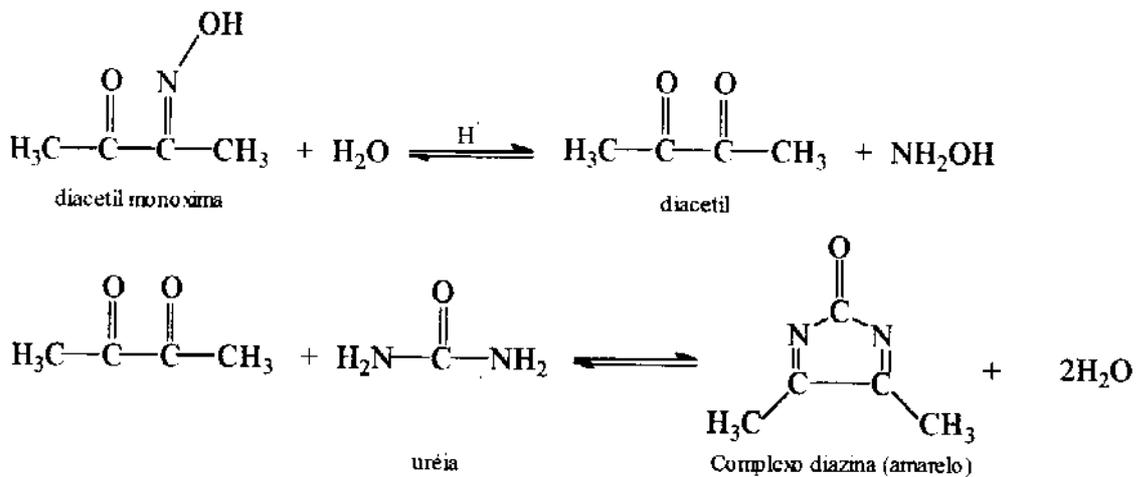
Baseia-se no processo de microdifusão de Conway e seu mecanismo é representado pelo esquema de Führ [8].

A amostra se difunde por capilaridade atravessando as várias zonas do papel cromatográfico, provocando uma série de reações em condições específicas, liberando amônia em concentração proporcional à de uréia.

O método apresenta vantagens como : a determinação quantitativa baseada numa reação específica, dispensa o uso de aparelhos ou reagentes especiais, sendo também um método simples e de fácil execução, porém é utilizado especificamente para amostras sorológicas.

2.4 Método Espectrofotométrico

É baseado na reação de uréia com diacetilmonoxima em meio fortemente ácido. A diacetilmonoxima é convertida em diacetil, composto menos estável que reage com a uréia para produzir um composto amarelo :

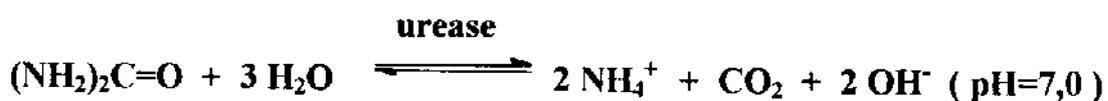


Este método, descrito inicialmente por Fearon [9], apresentou vários inconvenientes como : a intensificação da cor não era linear à concentração de uréia, o complexo era fotossensível, o elevado preço do reagente entre outros.

Foram propostas variações do método original [10] com o intuito de melhorar o processo como a introdução de íons férricos e tiosemicarbazida para minimizar a decomposição do complexo pela luz.

2.5 Métodos Enzimáticos

Métodos usuais para determinações enzimáticas de uréia são importantes testes rotineiros de diagnósticos feitos em laboratórios clínicos. Os métodos mais usados são aqueles que se utilizam dos produtos de hidrólise da uréia (via carbamato de amônio) como ilustra a reação :



2.5.1 Método Condutométrico

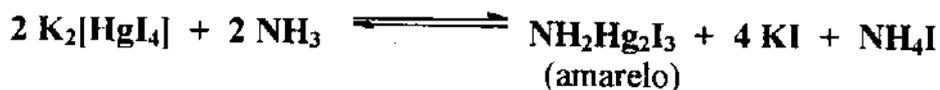
Tem como base o aumento da condutividade da água, pela formação de íons amônio na degradação da uréia. Este aumento da condutividade é relacionado à concentração inicial de uréia.

Este método é muito usado em sistemas “Flow Injection Analysis”, por sua simplicidade, rapidez nas análises e sensibilidade. A primeira menção deste método para determinação de uréia deve-se a Rey [11].

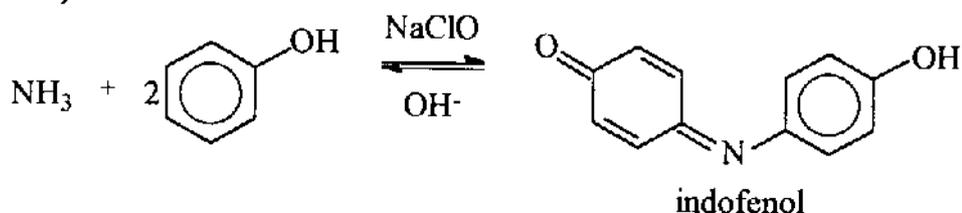
2.5.2 Método Espectrofotométrico

A amônia formada na degradação enzimática da uréia é geralmente quantificada pelo reagente de Nessler [12] ou pela reação de Berthelot [13].

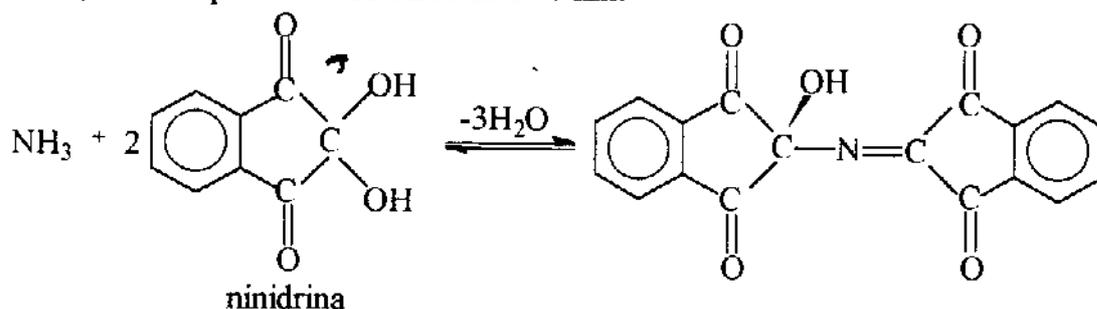
Com o reagente de Nessler, a amônia produzida reage com uma solução alcalina de tetra iodo mercurato II de potássio, formando um composto amarelo que absorve em comprimento de onda de 436 nm.



No procedimento desenvolvido por Chaney [14], a amônia liberada reage com fenol em presença de hipoclorito alcalino produzindo o indofenol, composto azul cuja absorção máxima se dá em 560 nm. A reação é conhecida como reação de Berthelot.



Existem ainda dois métodos espectrofotométricos muito usados na determinação enzimática de uréia: a reação com ninidrina, produzindo um composto que absorve em 546 nm, e a reação com glutamato desidrogenase, GDH, em comprimento de onda de 340 nm.



2.5.3 Método Potenciométrico

A maioria dos métodos eletroquímicos para determinação de uréia combinam a seletividade enzimática com a sensibilidade dos métodos de detecção potenciométricos.

O aumento na concentração de íons amônio, íons bicarbonato e íons hidroxila via degradação da uréia, podem ser detectados, respectivamente, ou por eletrodos íon-seletivos a amônio [15,16], ou por eletrodos sensores a gases (gás carbônico ou amônia) [17] ou ainda por eletrodos de membrana de vidro (medidas de pH) [18].

Em todos os casos há uma relação logarítmica entre o sinal obtido e a concentração de uréia.

2.5.4 Método Volumétrico

Esta metodologia consiste na conversão de uréia em carbonato de amônio, através da urease, e uma quantificação antes e depois da conversão, por meio de uma titulação ácido-base usando alaranjado de metila como indicador.

Descrito inicialmente por Folin [19], este procedimento pode ser aplicado diretamente em amostras com alto teor de proteínas, tais como soro sangüíneo, com resultados satisfatórios mesmo quando a quantidade de uréia presente for relativamente baixa.

CAPÍTULO III

POTENCIOMETRIA COM ELETRODOS ÍON-SELETIVOS

Como neste trabalho utilizou-se o campo da potenciometria para determinação enzimática de uréia, julgou-se conveniente estabelecer certos termos e parâmetros analíticos mais importantes nesta área, de acordo com a nomenclatura recomendada pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) [20,21].

1. GENERALIDADES

Até 1960, a maioria dos íons determinados potenciometricamente eram detectados ou por eletrodos inertes, como nos sistemas de óxido-redução, ou por eletrodos de primeira, segunda ou terceira classe [22], dependendo do número de fases separadas e em contato com a solução que está em equilíbrio. A maior exceção a esses tipos de eletrodos foi a determinação de íons hidrogênio por eletrodos de membrana de vidro, ou medidas de pH [23].

A partir do final da década de 60, com a introdução dos eletrodos de membrana líquida baseados em trocadores iônicos, surgiu uma grande variedade de eletrodos sensíveis a várias espécies iônicas como é discutido a seguir.

2. TERMINOLOGIA [24]

2.1 Eletrodos íon-seletivos

Eletrodos íon-seletivos podem ser definidos como sensores eletroquímicos que respondem a atividades iônicas de acordo com a equação proposta por Nernst:

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{z_x F} \ln (a_x) \quad , \text{ onde:} \quad \{1\}$$

E^0 é o potencial padrão da célula, R a constante dos gases, T a temperatura absoluta, z_x a carga iônica e a_x a atividade do íon x que se deseja determinar. O sinal da equação é positivo quando x é um cátion e negativo quando x é um ânion.

Deve-se salientar que tornou-se comum referir-se à resposta de um eletrodo como nernstiana, sempre que o potencial do eletrodo seja proporcional ao logaritmo da atividade do íon em questão, mesmo quando o valor da constante de proporcionalidade não seja exatamente $2,303 RT/zF$: para $z=1$, esta constante é igual a 59,1 mV a 25,0 °C, mas valores até 55,0 mV são referidos como nernstianos devido às condições em que cada determinação é feita. O termo sub-nernstiano é usado quando o valor desta constante estiver abaixo de 55,0 mV e super-nernstiano quando for maior que 60,0 mV.

Íon primário é o íon para o qual o eletrodo foi construído, sendo que a maioria dos eletrodos são mais seletivos a uma espécie em relação a outras. O determinando, ou analito, é a espécie a ser determinada. Nos métodos potenciométricos diretos, o determinando é quase sempre o íon primário, isto não se aplicando necessariamente aos métodos indiretos.

Interferente é definido como qualquer espécie, que não o íon primário, para o qual o eletrodo responde. Assim, é definido um coeficiente de seletividade potenciométrico, $K^{POT}_{A,B}$, como uma medida da seletividade de um eletrodo para o íon primário **A** na presença do interferente **B**. Quanto menor o valor de $K^{POT}_{A,B}$, mais seletivo será o eletrodo para o íon **A** na presença do íon **B**.

O tempo de resposta é definido como o tempo em que o eletrodo leva, quando ocorre uma mudança instantânea na atividade do analito, para variar em 1,0 mV a partir do potencial final de equilíbrio; este tempo de resposta depende das condições experimentais usadas, envolvendo vários parâmetros.

Um gráfico ou curva de calibração é aceito como a representação de uma diferença de potencial entre o eletrodo íon-seletivo e um eletrodo de referência (com valores positivos no topo do eixo das ordenadas) contra o logaritmo da atividade ou concentração do íon primário na célula medida (com o aumento da atividade ou concentração à direita do eixo das abcissas)- FIGURA I.

São definidos assim, o limite de detecção, L.D. , como sendo a menor quantidade do analito detectada pelo eletrodo e o limite nernstiano, L.N. , como a parte da curva que apresenta resposta linear (nernstiana) para uma dada faixa de atividades ou concentrações do analito.

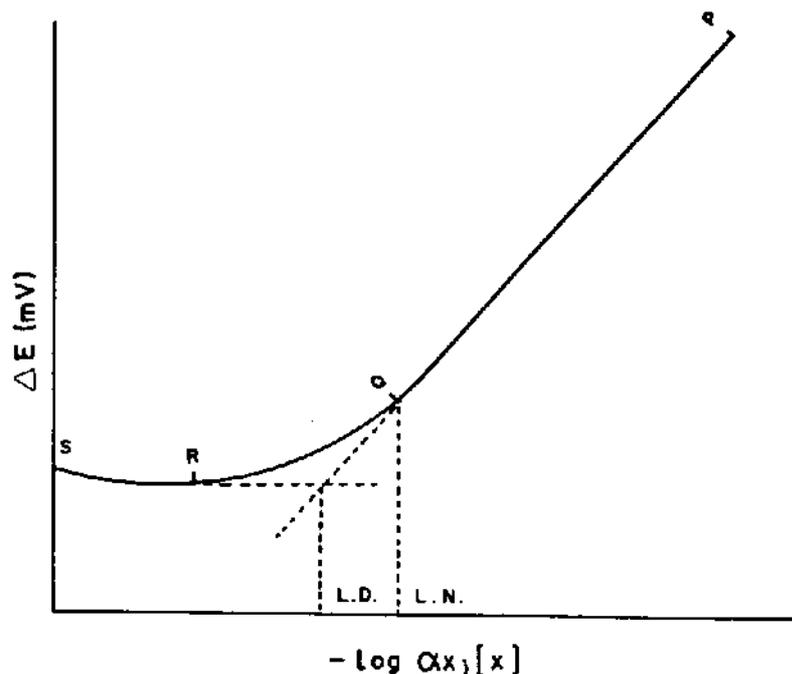


FIGURA I : Curva de calibração típica para um eletrodo íon-seletivo.

PQ - porção nernstiana da curva;

QR - presenças de interferente(s) e íon primário;

RS - presença(s) de interferente(s) somente.

A conexão entre um eletrodo indicador e um de referência (ou cátodo e ânodo em células eletroquímicas), é geralmente realizada por uma ponte salina que permite a passagem dos íons mas não permite a mistura das soluções.

No limite entre duas soluções não semelhantes, por exemplo, existe sempre uma alta resistência que envolve uma apreciável queda ôhmica estabelecendo-se um potencial denominado potencial de junção líquida, E_j .

O E_j constitui um componente obrigatório no potencial de todas as células nas quais exista uma junção entre soluções de eletrólitos com concentrações diferentes, sendo geralmente associado ao potencial padrão da célula, E^0 , bem como o potencial do eletrodo de referência.

As únicas células onde este componente do potencial não aparece são aquelas formadas por dois eletrodos, diferentes, imersos na mesma solução.

Para medidas de potencial com eletrodos íon-seletivos, EIS, é necessária a construção de células eletroquímicas. Assim, três tipos de células são comumente usadas

1^o) células sem junção líquida

Eletrodo referência/Solução amostra/EIS

2^o) células com uma junção líquida

Eletrodo referência/Solução referência/J/Solução amostra/EIS

3^o) células com duas junções líquidas

Eletrodo referência/Solução referência/J₁/ponte salina/J₂/Solução amostra/EIS

O eletrodo de referência é definido como um eletrodo cujo potencial não varia durante a medida na célula eletroquímica.⁸ Sua função é atuar como uma meia-célula de potencial constante contra as variações de potencial que podem ser medidas em várias amostras, pelo eletrodo íon-seletivo.⁸ Entretanto, nenhum eletrodo de referência adota um potencial absolutamente constante em todas as condições.⁸ Os três requisitos principais para que um eletrodo de referência seja considerado satisfatório são: reversibilidade, reprodutibilidade e estabilidade. ⁸

Os eletrodos de referência mais usados são o de calomelano e o de prata-cloreto de prata com potenciais bastante estáveis dependendo das condições usadas.

O eletrodo de calomelano é representado por:



onde x representa a concentração de KCl na solução. A reação do eletrodo é dada pela equação:



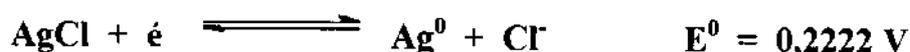
O potencial é dado por:

$$E = E^0 - 0,0591 \log [\text{Cl}^-] \quad \text{a } 25,0 \text{ }^\circ\text{C} \quad \{2\}$$

O eletrodo de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) é um fio de prata recoberto com cloreto de prata e em solução de cloreto de potássio saturada com cloreto de prata. São representados esquematicamente por:



sendo a reação parcial :



O maior problema desse eletrodo é a solubilidade relativamente alta do AgCl em soluções concentradas de íons cloreto, devido à formação de complexos, sendo necessária uma pré-concentração da solução interna com AgCl. Efeitos de histerese térmica são pequenos para ambos os eletrodos de referência.

O conceito de atividade é necessário devido ao comportamento não ideal das soluções, causado por interações entre as partículas.

A quantidade que é usada para exprimir melhor a disponibilidade de um íon em determinar as propriedades das soluções é a atividade relativa, quantidade esta que considera a interação do íon com sua vizinhança, relacionando-se com a concentração pela expressão:

$$a_x = \gamma_x C_x \quad , \quad \text{onde:} \quad \{3\}$$

a_x é a atividade relativa, γ_x é o coeficiente de atividade e C_x é a concentração molar da solução.

Em diluição infinita, ou em solução ideal, o coeficiente de atividade é unitário e a atividade do íon primário é proporcional à concentração da solução. Como geralmente o químico analítico está mais interessado na determinação da concentração de uma dada espécie, a força iônica da solução é mantida constante de forma apropriada. O coeficiente de atividade é uma função da força iônica da solução:

$$I = \frac{1}{2} \rho_0 \sum C_i z_i^2 \quad , \quad \text{onde:} \quad \{4\}$$

C_i é a concentração molar de cada íon presente, z_i a carga de cada íon na solução e ρ_0 a densidade do solvente utilizado. O coeficiente de atividade de um íon individual pode ser calculado pela expressão ampliada da lei de Debye-Hückel. Em água, a 25,0 °C :

$$\log \gamma_i = - \frac{1}{2} z_i^2 (I)^{1/2} / [1 + (I)^{1/2}] \quad \{5\}$$

Não há método conveniente para avaliar o coeficiente de atividade para íons individuais abstraindo-os dos outros. O coeficiente de atividade médio de um eletrólito $M_m N_n$ é dado por:

$$\log \bar{\gamma}_{\pm} = - \frac{1}{2} z_M z_N (I)^{1/2} / [1 + (I)^{1/2}] , \quad \text{onde:} \quad \{6\}$$

z_M e z_N são as cargas de M e N , sem levar em conta o sinal.

2.2 Seletividade Potenciométrica

Infelizmente, os eletrodos íon-seletivos não respondem exclusivamente ao íon-primário, sendo necessário avaliar sua seletividade na presença de outras substâncias interferentes. Segundo a IUPAC [20], interferente é qualquer espécie, diferente do íon primário, que afeta a medida do potencial da célula, quando presente na mesma solução.

Existem duas classes de interferentes:

- 1) aqueles em que o eletrodo responde como se fosse o íon primário;
- 2) aqueles que reagem com o íon primário na amostra, diminuindo sua concentração aparente.

Uma modificação da equação de Nernst, proposta por Nicolsky [25], pode ser usada para definir o grau de seletividade para um íon primário, \underline{A} , em relação a um interferente, \underline{B} ; para qualquer eletrodo íon-seletivo, o potencial da célula medido, em mV, é dado por:

$$E = K \pm \frac{RT}{z_A F} \ln (a_A + \sum_B K^{POT}_{A,B} a_B^{z_A/z_B}), \text{ onde: } \{1\}$$

z_A e z_B são as cargas dos íons \underline{A} e \underline{B} e o termo K , constante, inclui o potencial padrão do eletrodo indicador, E^0 , o potencial do eletrodo de referência e o potencial de junção líquida, E_j .

O termo $K^{POT}_{A,B}$ é chamado de coeficiente de seletividade potenciométrico. É uma medida da contribuição do íon interferente ao potencial medido, e quanto menor seu valor, mais seletivo será o eletrodo para o íon primário.

O valor do coeficiente de seletividade não é constante para todas as atividades de \underline{A} e de \underline{B} , dependendo, portanto, do método usado para sua determinação [26]. Existem dois métodos muito usados para este fim, o método das soluções separadas e o das soluções misturadas.

No método das soluções separadas, é medido separadamente o potencial de cada solução contendo o íon primário, em diferentes atividades, e o íon interferente, para uma atividade fixa, até que as medidas de potenciais sejam iguais, de onde o coeficiente de seletividade é calculado. Este método não simula as condições reais sob as quais os eletrodos são usados [27].

Já no método das soluções misturadas, pode-se manter a atividade do interferente fixa, usualmente 10^{-2} ou 10^{-3} M, e variar a atividade do íon primário, ou manter a atividade deste fixa e variar a atividade do interferente, por exemplo, quando o interferente é o íon H^+ ; neste caso, obtém-se curvas

para exibir a faixa de trabalho do eletrodo em amostras de diferentes pH's (Diagramas de Reilley).

Medindo-se os potenciais de soluções, com atividade fixa do interferente B, para diferentes atividades do ion primário A, e construindo-se um gráfico de potencial versus atividade de A, uma curva do tipo apresentada na FIGURA II é geralmente obtida. Haverá um ponto no qual o eletrodo responderá igualmente a ambos os ions e a relação

$$a_A = K^{POT}_{A,B} a_B^{z_A/z_B} \quad \{2\}$$

será satisfeita.

A intersecção da linha de resposta nernstiana extrapolada com a horizontal, de interferência total, define aquele ponto, podendo-se calcular $K^{POT}_{A,B}$ [28].

A equação {1} torna-se:

$$E = K \pm RT/z_A F \ln (2a_A') \quad \{3\}$$

A diferença de potencial para soluções A de atividade a_A , com e sem B de atividade a_B , é dada por:

$$E = RT/z_A F (\ln 2a_A' - \ln a_A') = 2,303 RT/z_A F \log 2 = (18,0/z_A) \text{ mV} \quad \{4\}$$

a 25,0 °C.

Então, encontra-se no gráfico a atividade de A na qual a linha experimental difere na resposta nernstiana extrapolada por $18,0/z_A$ mV. Assim:

$$K^{POT}_{A,B} = a_A (\text{gráfico}) / a_B (\text{fixada}) \quad \{5\}$$

O coeficiente de seletividade é de aplicação limitada. Seu uso deve ser feito com particular atenção, já que seus valores fornecem apenas uma idéia do grau de seletividade frente a interferentes, para cada tipo de eletrodo e metodologia usados.

Certamente, desempenhos de eletrodos baseados nos coeficientes de seletividade só devem ser feitos quando as medidas são realizadas identicamente para cada eletrodo.

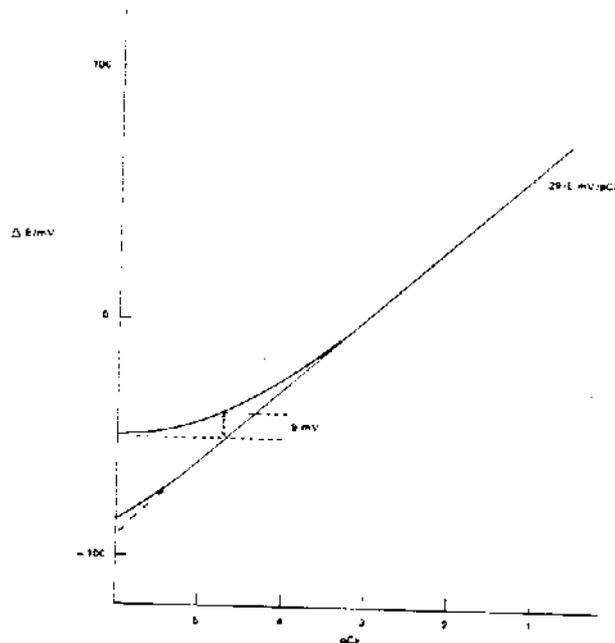


FIGURA II: Exemplo de curva típica de calibração potenciométrica para cálcio, na presença de interferente, sódio, para o cálculo do coeficiente de seletividade potenciométrico.

3. CLASSIFICAÇÃO DOS ELETRODOS ÍON-SELETIVOS

A grande variedade de eletrodos íon-seletivos baseiam-se nas propriedades de diferentes tipos de membranas as quais são definidas como uma fase finita no espaço separando duas outras fases e exibindo resistência à interação de diferentes espécies.

Baseado nos diferentes tipos de membranas, temos os seguintes tipos de eletrodos íon-seletivos [24] :

1. Eletrodos de membrana de vidro;
2. Eletrodos baseados em sais inorgânicos;
3. Eletrodos baseados em trocadores iônicos e suportes neutros;
4. Eletrodos sensores de gases;
5. Miscelânea.

3.1 Eletrodos de Membrana de Vidro

Em 1934, Lengyel e Blum [29] mostraram que a introdução de Al_2O_3 e B_2O_3 em vidro simples (para medidas de pH) aumentavam enormemente a

resposta do vidro a ions sódio e de forma nernstiana. Nicolsky [25] foi o primeiro a apresentar a equação de Nernst modificada, que descreve a resposta do eletrodo de vidro para ambos os ions, hidrogênio e sódio:

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln [a_{(H^+)} + K^{POT}_{H^+,Na^+} a_{(Na^+)}] \quad \{6\}$$

Nestes eletrodos, a resposta iônica seletiva a H^+ ou Na^+ é função da composição da membrana de vidro. No interior do vidro, a camada de silicato de sódio permanece intacta (vidro seco) e o potencial Donnan é gerado através de um mecanismo de troca iônica entre ions H^+ da camada externa (hidratada) e aqueles presentes na solução de medida.

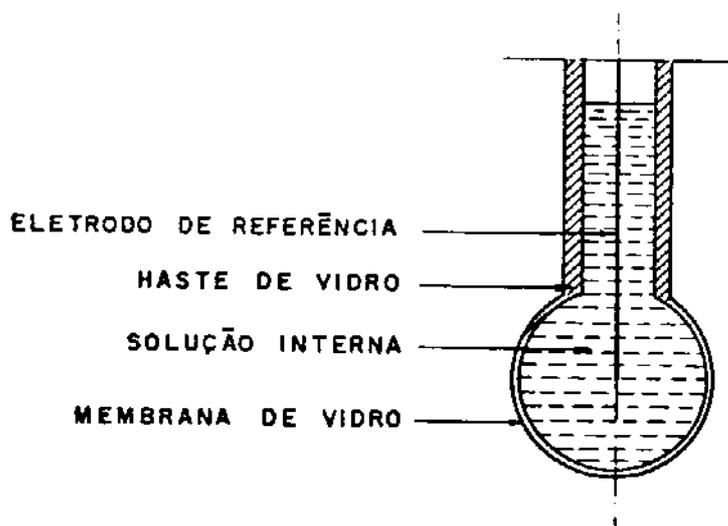


FIGURA III: Representação esquemática de um eletrodo de membrana de vidro.

3.2 Eletrodos baseados em Sais Inorgânicos

Os primeiros tipos dessa classe de eletrodos foram os de membranas heterogêneas onde o material ativo é disperso sobre uma matriz inerte. Tais eletrodos precederam os de membrana homogênea nos quais a membrana é composta por um cristal simples, tal como fluoreto de lantânio em eletrodos para fluoreto ou misturas homogêneas como nos eletrodos de prata e haletos em que as membranas são obtidas a partir de pastilhas prensadas de sais de prata co-precipitados com sulfeto de prata [30].

Os centros ativos, para troca iônica no interior da membrana, são fixos, sem mobilidade, ocorrendo mudanças nas propriedades do material ativo.

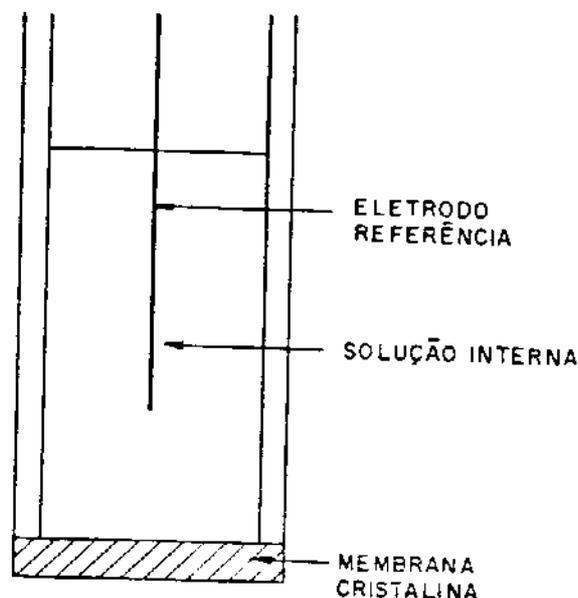


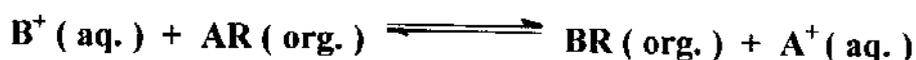
FIGURA IV: Representação esquemática de um eletrodo baseado em sais inorgânicos.

3.3 Eletrodos baseados em Trocadores Iônicos e Suportes Neutros

Nos sistemas em que a membrana consiste em uma fase líquida, a mesma é representada por um líquido imiscível em água, em que está dissolvida uma substância capaz de trocar o íon na solução para o qual o eletrodo é seletivo. Essa substância pode ser um complexo macrocíclico não carregado contendo o íon ou outro composto neutro. A solução é suportada em um diafragma poroso ou usada como um plastificante para um filme polimérico (eletrodos de membrana sólida).

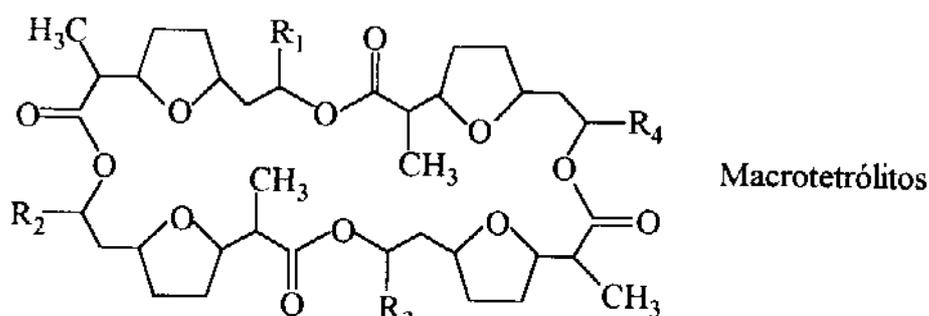
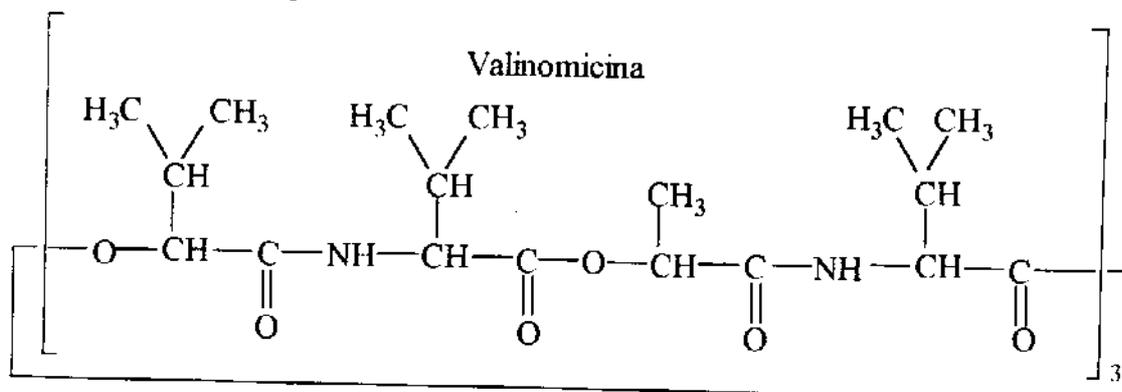
Nos sistemas de membrana líquida com o trocador iônico dissolvido, o sítio ativo e o íon movem-se através da membrana e na interface com a solução, ocorre o processo de troca iônica entre os íons do sítio ativo e os íons livres na fase aquosa, mecanismo responsável pela diferença de potencial na interface da membrana com a solução.

Para uma resposta nernstiana a um determinado íon A na presença de outro, B , é necessário que a posição de equilíbrio seja atingida:



onde R representa um grupo de sítios carregados [30].

Nesta classe, alguns ionóforos tem sido usados para determinações potenciométricas em eletrodos de membrana sólida, tais como a valinomicina para íons potássio e antibióticos macrotetrólitos para íons amônio, ilustrados na FIGURA V [3]:



$R_1=R_2=R_3=R_4=CH_3$ Nonactin

$R_1=R_2=R_3=CH_3 / R_4=C_2H_5$ Monactin

$R_1=R_3=CH_3 / R_2=R_4=C_2H_5$ Dinactin

$R_1=CH_3 / R_2=R_3=R_4=C_2H_5$ Trinactin

FIGURA V: Estruturas da valinomicina e de antibióticos macrotetrólitos utilizados como ionóforos neutros.

3.4 Eletrodos Sensores de Gases

Esses eletrodos são células eletroquímicas completas, incorporando o eletrodo ion-seletivo e o eletrodo de referência num mesmo dispositivo. São sensíveis às pressões parciais dos gases em solução sem sofrer interferência iônica apreciável, o que os distingue dos demais eletrodos.

Os mais conhecidos são os eletrodos de dióxido de carbono, amônia [31] e dióxido de enxofre, usados para determinar, respectivamente, íons

bicarbonato, amônio e sulfeto, que são convertidos aos respectivos gases por pré-tratamento da amostra.

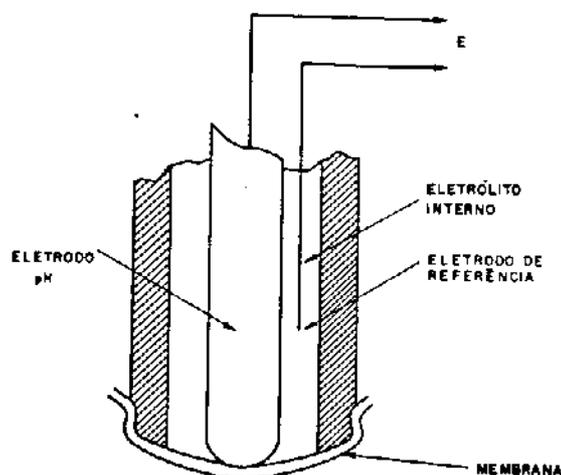


FIGURA VI: Eletrodo sensor de gás.

3.5 Miscelânea

Sensores nesta classe incluem, principalmente, os eletrodos enzimáticos e os surfactantes.

Os eletrodos enzimáticos [32] envolvem reações do tipo enzima-substrato sendo bastante específicos e aliada à elevada seletividade potenciométrica são desenvolvidos excelentes métodos de análise.



Os eletrodos surfactantes são semelhantes àqueles baseados em trocadores iônicos orgânicos, respondendo a surfactantes catiônicos [33] e aniônicos [34].

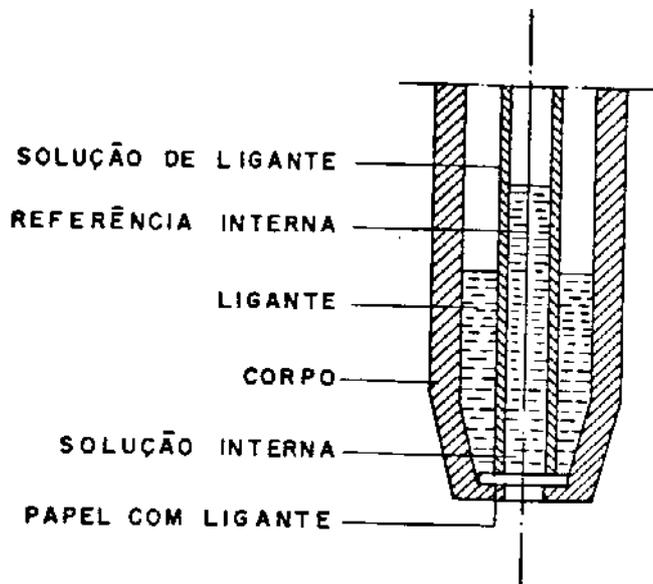


FIGURA VII: Eletrodo de membrana líquida.

CAPÍTULO IV

ENZIMAS

1. INTRODUÇÃO [35]

Enzimas são catalisadores especiais de origem biológica presentes em todos os seres vivos, acelerando várias reações metabólicas importantes para a vida.

Sendo proteínas, têm elevado peso molecular, na faixa de 1×10^4 a 2×10^6 g/mol, são termolábeis e desnaturam-se pela elevação da temperatura. Como a maioria dos catalisadores, as enzimas atuam no abaixamento da energia de ativação, acelerando a velocidade de reação e atingindo o estado de equilíbrio sem modificá-lo e sem modificarem-se.

Muitas enzimas são isoladas de forma pura ou cristalina, sendo algumas provenientes de mais de uma fonte natural. O estudo sistemático de Enzimologia começou no século XIX com procedimentos de purificação e determinação de estruturas. Liebig e Wöhler [36] extraíram suco de amêndoas para catalisar a hidrólise da glicose.

Grande parte da história da bioquímica é a história da pesquisa enzimática. O nome enzima (“no levedo”) somente foi usado em 1877, porém, muito anteriormente já se suspeitava que os catalisadores biológicos participavam da fermentação do açúcar para formar o álcool (daí o nome inicial “fermentos”). A primeira teoria geral de catálise química, publicada em 1835 por J.J. Berzelius, incluía um exemplo do que se conhece hoje como uma enzima, a diastase do malte, e indicava que a hidrólise do amido era mais eficientemente catalisada pela diastase do que pelo ácido sulfúrico.

Uma enzima é capaz de catalisar uma reação particular de um substrato mesmo existindo isômeros desse substrato ou compostos de estrutura similar devido a sua alta especificidade, além de sua elevada sensibilidade.

Atualmente já se conhecem mais de 2000 enzimas, sendo algumas delas comercializadas na forma pura e cristalina. O seu uso em química analítica e outras áreas correlatas é bastante desenvolvido, permitindo a determinação não só de substratos variados, mas também de alguns metais que atuam como ativadores (ou inibidores) de algumas enzimas, os chamados cofatores enzimáticos [37].

Ainda que a maioria das enzimas envolvidas nas atividades metabólicas fundamentais das células tenham sido identificadas, muitos problemas importantes permanecem sem solução, incluindo o controle genético da síntese enzimática, os mecanismos moleculares pelos quais a atividade enzimática é regulada, e o papel das formas múltiplas de certas enzimas no desenvolvimento e na diferenciação. Acima de tudo, estudos constantes tem sido realizados, em termos moleculares, para se descobrir como as enzimas catalisam as reações químicas com eficiência, precisão e especificidade tão elevadas [38].

Uma classificação sistemática das enzimas foi adotada pela Enzyme Commission [38], devido a descoberta de novas estruturas. O novo sistema divide as enzimas em seis classes principais e conjuntos de subclasses, de acordo com o tipo de reação catalisada - TABELA I.

TABELA I: Classificação internacional das enzimas (nome das principais classes, números de código e tipos de reações catalisadas):

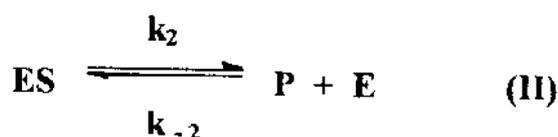
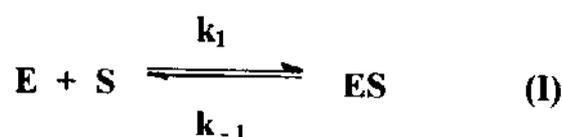
1. Óxido-redutases (reações de oxi-redução)	
1.1 agindo em >CH—OH	
1.2 agindo em >C=O	
1.3 agindo em >C=CH—	4. Liases (adição à duplas ligações)
1.4 agindo em >CH—NH_2	4.1 >C=C<
1.5 agindo em >CH—NH—	4.2 >C=O
1.6 agindo em NADH; NADPH	4.3 >C=N—
2. Transferases (transferência de grupos funcionais)	5. Isomerases (reações de isomerização)
2.1 grupos de um carbono	5.1 racemases e epimerases
2.2 grupos aldeídicos ou cetônicos	5.2 cis-trans isomerases
2.3 grupos acila	
2.4 grupos glicosila	6. Ligases (formação de ligações com
2.7 grupos fosfato	desdobramento de ATP)
2.8 grupos contendo S	6.1 C—O
3. Hidrolases (reações de hidrólise)	6.2 C—S
3.1 ésteres	6.3 C—N
3.2 ligações glicosídicas	6.4 C—C
3.4 ligações peptídicas	
3.5 outras ligações C—N	
3.6 anidridos ácidos	

Cada enzima recebe um nome recomendado (para uso diário), um nome sistemático (para identificar a reação catalisada) e um número de classificação (para publicações científicas).

2. CINÉTICA ENZIMÁTICA [38]

A teoria geral da ação enzimática e cinética para sistemas com um substrato foi desenvolvida por Michaelis-Menten.

Segundo esta teoria, a enzima, **E**, primeiro combina-se com o substrato, **S**, para formar um complexo enzima-substrato intermediário e transitório, **ES**. Este complexo resulta de uma interação entre o sítio ativo da enzima e a molécula do substrato que se rompe para formar o(s) produto(s), **P**, liberando a enzima.



onde k_1 , k_{-1} , k_2 e k_{-2} são constantes de velocidade.

As reações são consideradas reversíveis.

A velocidade de reação no tempo t , ou seja, a velocidade de consumo de substrato ou formação de produto diminui em função do tempo, devido à diminuição da concentração de substrato no decorrer da reação.

Uma ampliação da hipótese de Michaelis-Menten, assume um estado de equilíbrio estacionário, onde a velocidade de formação do complexo enzima-substrato, **ES**, é igual à sua velocidade de desdobraimento, de onde a concentração de **ES** permanece constante.

A concentração total de enzima, E_t , é a soma das formas livre e combinada:

$$[E_t] = [E] + [ES] \quad \{1\}$$

É necessário definir matematicamente uma expressão geral para a velocidade inicial de reações catalisadas por enzimas, v_0 , considerando-se que essas reações ocorrem em duas etapas, dadas por (I) e (II). A velocidade inicial é, evidentemente, igual à velocidade de desdobraimento de ES :

$$v_0 = d[P]/dt = k_2 [ES] \quad \{2\}$$

Entretanto, uma vez que nem k_2 nem $[ES]$ podem ser determinados diretamente, devemos encontrar uma expressão alternativa para v_0 em termos de outras variáveis que possam ser medidas mais facilmente. Assim, a velocidade de formação de ES, a partir de E e S, (I), é dada por:

$$d[ES]/dt = k_1 [E][S] = k_1 ([E_t] - [ES]) [S] \quad \{3\}$$

Ainda que ES possa também ser formado a partir de E e P, pela reação inversa (II), a velocidade dessa reação pode ser desprezada, uma vez que estamos considerando o início da reação quando a concentração de substrato é muito elevada e a concentração de produto é próxima de zero.

A velocidade de desdobraimento de ES é dada por:

$$- d[ES]/dt = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad \{4\}$$

Assumindo o estado de equilíbrio estacionário, temos:

$$k_1 ([E_t] - [ES]) [S] = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad \{5\}$$

Rearranjando a equação {5}, obtemos:

$$([S] ([E_t] - [ES]))/[ES] = (k_{-1} + k_2)/k_1 = K_M \quad \{6\}$$

A constante K_M é assim definida como constante de Michaelis-Menten. Deduzindo-se o valor de $[ES]$ da expressão {6} :

$$[ES] = [E_t] [S] / (K_M + [S]) \quad \{7\}$$

Substituindo o termo $[ES]$ na equação da velocidade inicial, v_0 , temos:

$$v_0 = k_2 [ES] = k_2 ([E_t] [S] / (K_M + [S])) \quad \{8\}$$

Quando a concentração de substrato é tão elevada que, essencialmente, toda enzima no sistema está presente como o complexo ES, isto é, quando a enzima está saturada, atingimos a velocidade inicial máxima, $v_{m\acute{a}x}$, dada por:

$$v_{m\acute{a}x} = k_2 [E_t] \quad \{9\}$$

Finalizando, chegamos à equação de Michaelis-Menten, para um substrato:

$$v_o = v_{m\acute{a}x} [S] / (K_M + [S]) \quad \{10\}$$

Os valores das constantes cinéticas, K_M e $v_{m\acute{a}x}$, podem ser obtidos de um gráfico v_o versus $[S]$ como se segue:

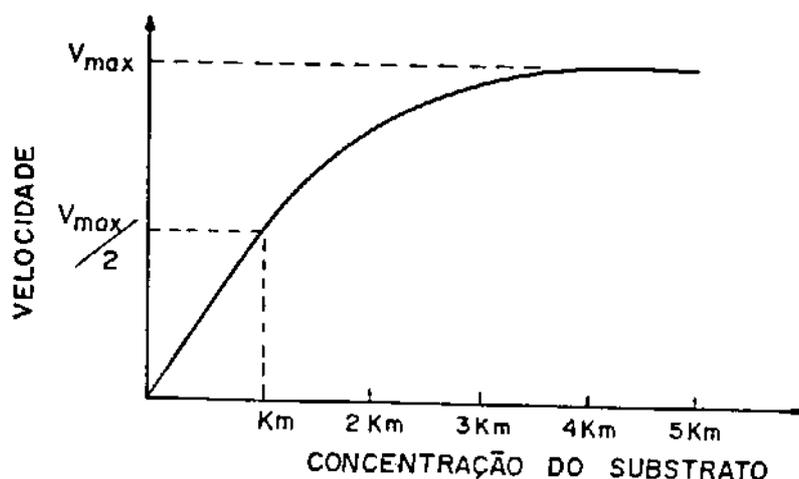


FIGURA I: Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial da reação enzimática.

A velocidade inicial de uma reação enzimática é então uma função da concentração de enzima e do substrato - equação {10}. Fixando-se a concentração da enzima, a velocidade aumenta com a concentração do substrato até certo ponto quando o excesso de substrato é alcançado e depois da qual, não há mais aumento na velocidade reacional pela adição de mais substrato.

O valor de K_M pode ser considerado como inversamente proporcional à afinidade da enzima pelo substrato; quanto menor o seu valor, maior será a afinidade e vice-versa. Assim, esta constante é um bom parâmetro quantitativo

de uma reação enzimática, não dependendo da concentração de enzima. O valor de K_M é igual à concentração de substrato na qual a velocidade inicial da reação é a metade da velocidade máxima, sendo expresso em mol/L.

Outras formas da equação de Michaelis-Menten são também usadas para se determinar K_M e $v_{m\acute{a}x}$, como a equação de Lineweaver-Burk que lineariza a equação {10} tomando-se o recíproco da mesma:

$$1/v_o = (K_M / v_{m\acute{a}x}) 1/[S] + (1/v_{m\acute{a}x}) \quad \{11\}$$

Um gráfico $1/v_{m\acute{a}x}$ versus $1/[S]$ é uma reta com coeficiente angular de $K_M/v_{m\acute{a}x}$ e intercepto $1/v_{m\acute{a}x}$ nas ordenadas e $-1/K_M$ nas abscissas.

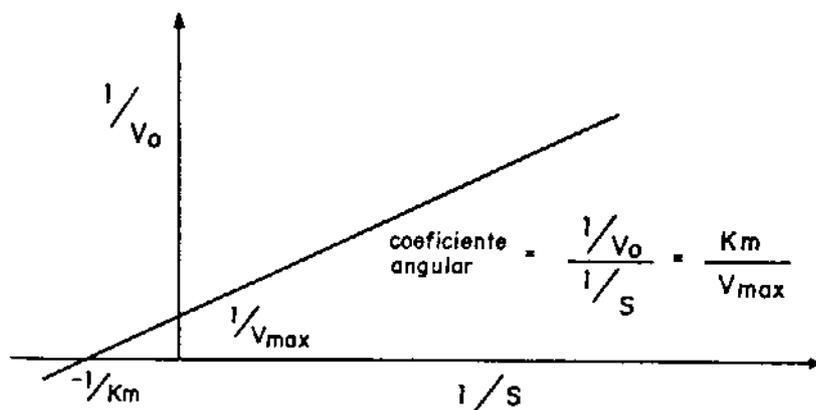


FIGURA II: Linearização da equação de Michaelis-Menten segundo Lineweaver-Burk.

3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA [35]

A velocidade inicial de uma reação enzimática é diretamente proporcional ao número de sítios ativos presentes, quando a concentração de substrato não está em níveis de saturação e outras variáveis são otimizadas e mantidas constantes.

A saturação do substrato (elevada concentração) limita a reação apenas pela concentração da enzima. Nestas condições, a atividade enzimática pode ser estimada pelo acompanhamento da velocidade reacional.

A atividade enzimática é função direta de suas estruturas terciária e quaternária. Todo tratamento que modifique a conformação da enzima como aquecimento, alteração do pH do meio e outros, modifica também a estrutura do sítio ativo diminuindo suas propriedades catalíticas.

A unidade de atividade é estabelecida através da medida da velocidade de reação a partir de uma quantidade de substrato consumido (ou produto formado), numa unidade de tempo e temperatura específicos.

Grande número de definições de unidades tem sido usadas. Uma nova unidade internacional para atividade enzimática é recomendada pela Enzyme Commission [38], denominada katal (kat); define-se como a quantidade de enzima que transforma 1 mol/s de substrato à 25,0 °C. A nova unidade está de acordo com as dimensões das constantes de velocidade em cinética química, sendo expressa também em termos de seus submúltiplos, mili, micro e nano katal.

Outras expressões de atividade podem ser usadas:

- 1) Atividade específica - expressa em unidades de enzima por miligrama de proteína (U / mg proteína);
- 2) Atividade molecular - expressa como unidades por micromol de enzima em condição ótima de substrato (número de moléculas de substrato transformadas por minuto por molécula de enzima);
- 3) Centro de atividade catalítica - definido como o número de moléculas de substrato transformada por minuto por centro catalítico de enzima;
- 4) Concentração em unidades por mililitro (U / mL).

4. FATORES QUE MODIFICAM A CINÉTICA ENZIMÁTICA

Existem fatores que afetam as reações enzimáticas atuando no mecanismo cinético dessas reações, podendo aumentar ou diminuir a velocidade reacional, pela modificação na estrutura dos sítios ativos das diferentes enzimas, e, conseqüentemente, alterando a atividade catalítica.

Os principais fatores são: concentração do substrato, concentração da enzima, presença ou ausência de ativadores e inibidores, temperatura, pH e força iônica da solução [35].

4.1 Influência da concentração de Substrato

Para concentrações de substrato muito baixas, a velocidade inicial de reação é diretamente proporcional à concentração de substrato, aplicando-se a cinética de reações de primeira ordem.

$$v_0 = (v_{\text{máx}} / K_M) [S] \quad \{12\}$$

Quando a concentração de substrato é elevada, a enzima é considerada saturada com seu substrato e a reação é, essencialmente, de ordem zero.

$$v_0 = v_{\text{máx}} \quad \{13\}$$

A velocidade inicial não depende da concentração de substrato.

À medida que a concentração de substrato vai aumentando, a velocidade inicial de reação se reduz e não mais se torna aproximadamente proporcional à concentração de substrato; nesta zona, a reação é de ordem mista.

Podem ocorrer também, uma diminuição na velocidade da reação por uma elevada concentração de substrato ou por outras causas como a competição ou formação de complexos com duas ou mais moléculas de substrato combinando-se com um sítio ativo da enzima apenas.

4.2 Influência da concentração da Enzima

Teoricamente um aumento na velocidade reacional pode ser observado por um aumento na concentração de enzima, mas esta linearidade é interrompida para concentrações muito altas da mesma. Isto não significa queda de atividade, mas limite no método de detecção.

$$v_0 = (k_2 [S] / (K_M + [S])) E_t \quad \{14\}$$

Os desvios da linearidade são provavelmente devido a algumas medidas na presença de agentes ativadores ou inibidores na preparação das enzimas.

4.3 Influência de Ativadores

Ativadores ou cofatores enzimáticos são substâncias necessárias à enzima para torná-la catalisador ou aumentar seu poder catalítico. O efeito da concentração de um ativador na velocidade inicial é similar ao da concentração de substrato. Em concentrações elevadas, a enzima é ativada ao máximo e a velocidade passa a não depender mais da concentração do ativador.

Alguns ativadores são íons metálicos simples como Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} ou podem ser substâncias orgânicas complexas como derivados vitamínicos [39].

Nas enzimas que requerem íons metálicos como cofatores, estes podem servir como o centro catalítico primário, um grupo de ligação para unir o substrato e a enzima em conjunto (via a formação de um complexo de coordenação), ou ainda um agente estabilizando a conformação da proteína em sua forma cataliticamente ativa, como por exemplo a enzima ferro-porfirínica *catalase*, que catalisa a decomposição muito rápida do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

As enzimas que requerem íons metálicos são algumas vezes denominadas metaloenzimas.

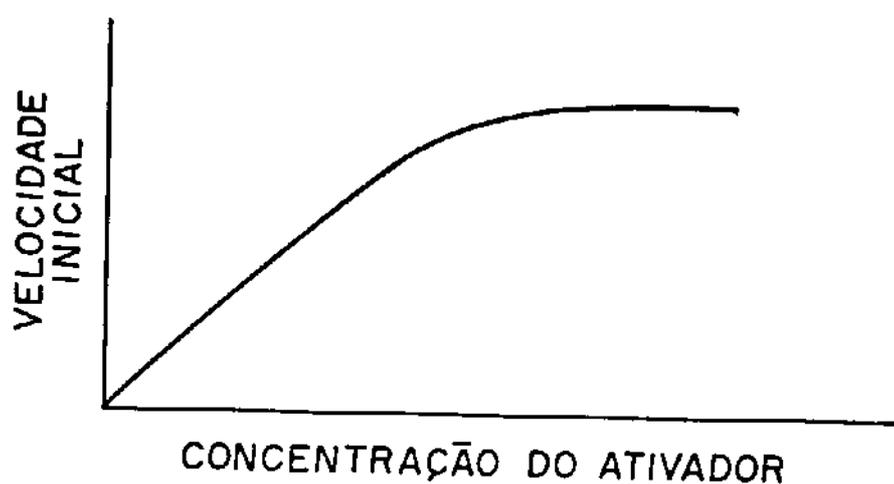


FIGURA III: Variação da velocidade inicial de uma reação enzimática com o aumento da concentração de um ativador genérico.

4.4 Influência de Inibidores

Estudos de inibição geralmente indicam algo em relação à especificidade de uma enzima, a arquitetura física e química do sítio ativo e o mecanismo cinético da reação [40].

O inibidor é uma substância que causa uma redução na velocidade de uma reação catalítica, reagindo com o próprio catalisador ou com o substrato.

As enzimas são muito sensíveis a traços de metais e a inibição de reações enzimáticas tem sido usada para a determinação do agente inibidor, geralmente um metal. Este agente pode ou não causar um envenenamento irreversível da enzima tornando a mesma inativa cataliticamente [41].

Os três tipos principais de inibição enzimática reversível - competitiva, não-competitiva e incompetitiva - podem ser distinguidas experimentalmente pelos efeitos do inibidor sobre a cinética de reação da enzima, que pode ser analisada em termos da equação básica de velocidade de Michaelis-Menten, já vista anteriormente, através dos parâmetros K_M e $v_{m\acute{a}x}$ [38].

4.4.1 Inibição Competitiva

O traço marcante da inibição competitiva é que o inibidor pode combinar-se com a enzima livre de tal forma que ele compete com o substrato normal pela ligação ao sítio ativo. Um inibidor competitivo reage reversivelmente com a enzima para formar um complexo enzima-inibidor, **EI**, análogo ao complexo enzima-substrato.



A molécula do inibidor não é quimicamente alterada pela enzima, sendo definida uma constante do inibidor, K_I , dada por:

$$K_I = [EI] / [E] [I]$$

A inibição competitiva é reconhecida experimentalmente pois a inibição percentual para uma concentração fixa do inibidor é reduzida pelo aumento da concentração do substrato.

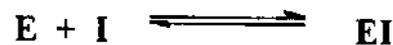
Quando gráficos do tipo Lineweaver-Burk são obtidos, para diferentes concentrações do inibidor, estes produzem linhas retas interceptando o eixo $1/v_0$ num único ponto. A presença de um inibidor competitivo aumenta o K_M aparente da enzima para o substrato, ou seja, faz com que seja necessária uma concentração mais elevada de substrato para atingir a velocidade inicial máxima da reação.

A partir da relação entre a estrutura molecular de um inibidor competitivo e sua afinidade pela enzima, informações valiosas sobre a estrutura e a geometria do sítio ativo podem ser obtidas, abordagem esta muito importante no mapeamento dos centros catalíticos da enzima.

4.4.2 Inibição Não-competitiva

Um inibidor não-competitivo pode combinar-se seja com a enzima livre seja com o complexo enzima-substrato, **ES**, interferindo na ação de ambos. Estes inibidores ligam-se a um sítio da enzima diferente do sítio ativo, muitas vezes deformando a molécula enzimática, de modo que ela não forma o complexo **ES** na velocidade usual e este não se desdobra na velocidade normal para originar os produtos. Esses efeitos não são revertidos pelo aumento da concentração de substrato.

Na inibição não-competitiva, a reação com o inibidor gera duas formas inativas, **EI** e **ESI**:



para as quais existem duas constantes de inibição:

$$K_I^{EI} = [EI] / [E] [I]$$

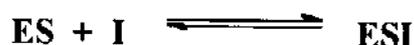
$$K_I^{ESI} = [ESI] / [ES] [I]$$

que podem ou não serem iguais.

Os gráficos de Lineweaver-Burk obtidos, diferem na inclinação não apresentando uma interceptação comum no eixo $1/v_o$. A interceptação no eixo $1/v_o$ é maior para a enzima inibida do que para a enzima não inibida, indicando que $v_{máx}$ é diminuída pelo inibidor e que não pode ser restabelecida mesmo pela adição de concentrações elevadas de substrato, ou seja, o valor de K_M permanece inalterado.

4.4.3 Inibição Incompetitiva

Neste tipo de inibição, nome este não muito adequado, caracteriza-se pelo fato de o inibidor não se combinar com a enzima livre nem afetar a reação com seu substrato normal; contudo, ele combina-se com o complexo **ES** para formar um complexo inativo enzima-substrato-inibidor, **ESI**, incapaz de sofrer a etapa subsequente da reação originando os produtos:



A constante do inibidor é dada por:

$$K_i = [ESI] / [ES] [I]$$

A inibição incompetitiva é reconhecida nos gráficos $1/v_0$ versus $1/[S]$, em concentrações fixas de inibidor. É típico deste tipo de inibição que a inclinação dos gráficos permanece constante para concentrações crescentes de inibidor, porém, a velocidade inicial máxima diminui. A inibição incompetitiva é rara em reações de um substrato, mas comum em reações contendo dois ou mais substratos.

TABELA II: Resumo dos efeitos dos inibidores nos gráficos de Lineweaver-Burk, duplo-recíproco: $1/v_0$ versus $1/[S]$:

INIBIÇÃO	INCLINAÇÃO	INTERCEPTO
AUSENTE	$K_M/v_{m\acute{a}x}$	$1/v_{m\acute{a}x}$
COMPETITIVO	$K_M/v_{m\acute{a}x}(1 + ([I]/K_I))$	$1/v_{m\acute{a}x}$
NÃO-COMPETITIVO*	$K_M/v_{m\acute{a}x}(1 + ([I]/K_I))$	$1/v_{m\acute{a}x}(1 + ([I]/K_I))$
INCOMPETITIVO	$K_M/v_{m\acute{a}x}$	$1/v_{m\acute{a}x}(1 + ([I]/K_I))$

* Considerando ambos os K_I como sendo iguais.

4.4.4 Inibição Irreversível: modificação enzimática

Algumas enzimas sofrem inativação irreversível quando são tratadas com agentes capazes de modificar, através de ligação covalente e permanente, um grupo funcional necessário para a catálise tornando a molécula enzimática inativa.

Este tipo de inibição não pode ser analisado pelos princípios de Michaelis-Menten, que consideram a formação dos complexos EI ou ESI como reversíveis.

Muitas vezes essa inibição irreversível se estabelece lentamente em comparação com a cinética de reação normal da enzima, de maneira que a inibição é inicialmente incompleta, porém, aumenta continuamente com o tempo, devido à modificação química de uma fração progressiva de moléculas enzimáticas. Diz-se, então, que o catalisador biológico está envenenado, ou seja, inativo.

4.5 Influência da Temperatura

A reação enzimática consiste de três passos: a formação do complexo enzima-substrato, a conversão deste num complexo enzima-produto e a dissociação deste último em produtos e enzima livre. O efeito total da temperatura na reação resultará na separação desses três passos individuais.

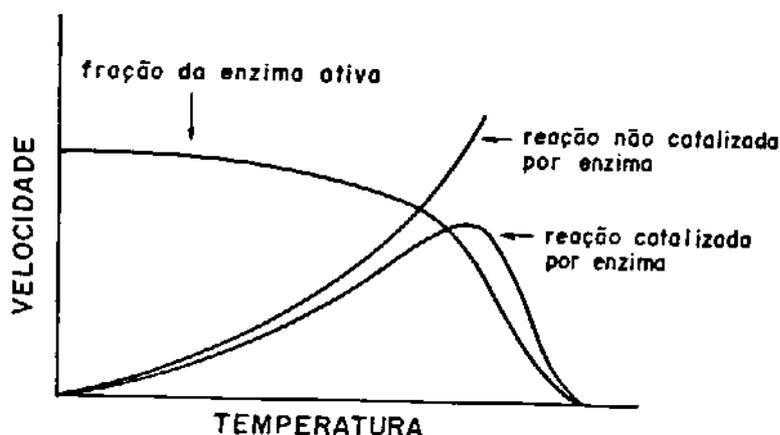


FIGURA IV: Efeito da temperatura na velocidade de reação enzimática.

Com o aquecimento, a energia livre de Gibbs e a entropia associadas, contribuirão para os processos termodinâmicos observados:

$$dG = dH - T dS \quad \{15\}$$

Para cada enzima existe uma temperatura ótima para um determinado conjunto de condições experimentais. A velocidade de reação aumenta à medida em que se eleva a temperatura. Este aumento leva a um aumento da agitação molecular e da frequência de colisão entre as moléculas da enzima e do substrato, aumentando também a desnaturação protéica pela modificação da estrutura espacial da enzima.

Para evitar-se grandes perdas de atividade, as enzimas são acondicionadas sob refrigeração, entre 2 e 5 °C. A temperatura recomendada para se desenvolver reações enzimáticas é de 25 °C, embora possa otimizar-se

a mesma de acordo com as condições experimentais de análise mais satisfatórias.

Ainda que muitas enzimas sejam inativadas em temperaturas acima de 55 °C, algumas são bastante estáveis e mantêm a atividade em temperaturas muito elevadas, como, por exemplo, as enzimas de várias espécies de bactérias termofílicas que habitam fontes de água quente, apresentando atividade em temperaturas da ordem de 85 °C [38].

4.6 Influência do pH

As enzimas apresentam um pH ótimo no qual tem atividade máxima, sendo determinado experimentalmente para cada condição de trabalho.

A forma do perfil de atividade em função do pH varia usualmente com a concentração do substrato, uma vez que o K_M da maioria das enzimas se altera com o pH. Essas curvas serão mais significativas se a enzima for mantida saturada com seu substrato em todos os valores de pH estudados. Em muitos casos de cinética enzimática, o pH é mantido constante no seu valor ótimo ou próximo deste.

O pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao pH de seu meio intracelular normal, que pode estar saturado na parte ascendente ou descendente de seu perfil de atividade em função do pH. Isso sugere que a inter-relação pH-atividade enzimática, pode ser um fator de controle intracelular da atividade da enzima [38].

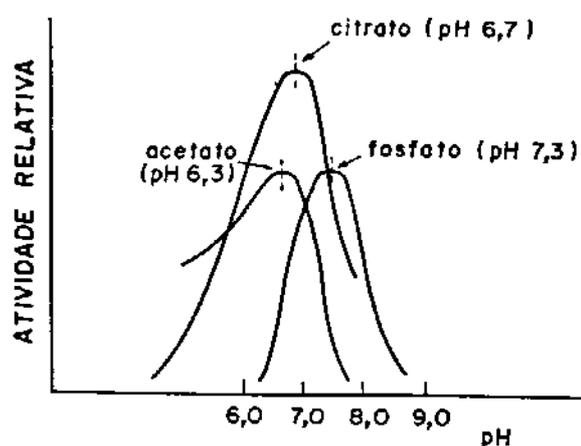


FIGURA V: Perfil das curvas de atividade relativa de urease em função do pH, feitas em diferentes soluções-tampão.

Os sítios ativos das enzimas são geralmente compostos por grupos ionizáveis, que devem estar na forma iônica apropriada para manter sua conformação. É fácil compreender que quando um grupo - COO⁻ do sítio ativo é necessário à fixação do substrato, a diminuição do pH do meio acarreta sua transformação em - COOH, não permitindo mais a imobilização do substrato e suprimindo a atividade da enzima.

Além desse fator, meios fortemente ácidos ou alcalinos contribuem para a desnaturação da enzima, modificando a estrutura tridimensional com perda da atividade catalítica.

4.7 Influência do Sistema Tampão - Força Iônica

A força iônica afeta a reação enzimática pela mudança no equilíbrio da mesma. A atividade de um sistema enzimático depende não só do valor de pH, mas também do tipo de solução tampão usada, que pode afetar a atividade ou a estabilidade de uma enzima, devido à presença de cargas, ativação aniônica, termodinâmica da reação, entre outros.

Para obter-se resultados reprodutíveis, deve-se eliminar cuidadosamente íons interferentes e controlar a força iônica para se assegurar a concentração efetiva dos reagentes.

CAPÍTULO V

IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas com fins analíticos tem sido limitado devido a algumas desvantagens como: altos custos para extração e purificação das macromoléculas enzimáticas, instabilidade em solução, baixa precisão e sua não recuperação.

A imobilização sobre suporte insolúvel aumenta a estabilidade enzimática, facilitando o uso em análises químicas.

Em 1916, Nelson e Griffin [42] mostraram que a invertase adsorvida em carvão, conservava sua atividade catalítica, sendo usada várias vezes.

A partir de 1960, as pesquisas foram intensificadas utilizando-se novos suportes poliméricos como derivados de poliamino-estireno e cloreto de polivinila.

2. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO [35]

Existem vários tipos de imobilização enzimática, desde aqueles envolvendo interações fracas do tipo adsorptivas, até aquelas onde há uma ligação química propriamente entre grupos reativos da enzima e de um suporte apropriado.

De um modo geral, a imobilização enzimática oferece vantagens em relação à enzima solúvel como:

- 1) reutilização, diminuindo o custo por análise;
- 2) maior estabilidade, pois são mantidas num ambiente químico semelhante àquele encontrado na natureza;
- 3) interferências reduzidas frente a inibidores presentes.

2.1 Imobilização por Oclusão

Neste processo, as moléculas da enzima ficam retidas dentro de uma rede tridimensional de um polímero insolúvel em água ou dentro de microcápsulas delimitadas por uma membrana semi-permeável, permitindo somente a passagem do substrato e produtos reacionais.

A imobilização em cloreto de polivinila (PVC), consiste na incorporação da enzima dentro da matriz de PVC. As membranas obtidas apresentam boas características mecânicas e alta seletividade, embora outros polímeros também possam ser usados tais como poliacrilamida, metacrilato, amido, entre outros. Algumas vezes são adicionados agentes plastificantes com o propósito de tornar o polímero mais flexível nas condições de uso.

Menos usada é a técnica de microencapsulação [43], onde uma solução aquosa da enzima e um monômero hidrofílico são misturados com um solvente orgânico insolúvel em água; a adição de um segundo monômero hidrofóbico provoca uma reação de polimerização, levando à formação de uma membrana ao redor das microgotículas, assim geradas.

2.2 Imobilização por Adsorção

Neste processo, estão envolvidas forças de interação fracas entre o suporte e a enzima (Van der Waals ou pontes de hidrogênio). Entre os adsorventes mais usados estão o quartzo, o vidro, o carvão ativo, a sílica-gel, a alumina e resinas de troca iônica [44].

A maior vantagem deste método reside na simplicidade e no emprego de condições brandas de imobilização, preservando a atividade enzimática. Porém, devido às interações envolvidas, no decorrer do tempo há uma dessorção progressiva das enzimas, diminuindo o tempo de vida útil da enzima imobilizada.

2.3 Imobilização por Ligação Covalente

Este método envolve a formação de ligação química efetiva entre a enzima e grupos reativos de um suporte. Para evitar a desnaturação enzimática, é necessário proceder a uma ativação prévia dos grupos funcionais do suporte.

Os suportes são escolhidos por características como solubilidade, presença de grupos funcionais, estabilidade mecânica e área superficial. Os mais usados são o vidro poroso, poliestireno, agarose, celulose, carboximetil-celulose, nylon [45] e outros.

É uma técnica simples e que utiliza menores quantidades de enzimas, muito usada quando o preço das mesmas é elevado. O inconveniente principal

está no risco de inativação total ou parcial da enzima no decorrer da reação de fixação.

TABELA 1: Grupos funcionais de enzimas que participam dos processos de imobilização sobre suportes apropriados:

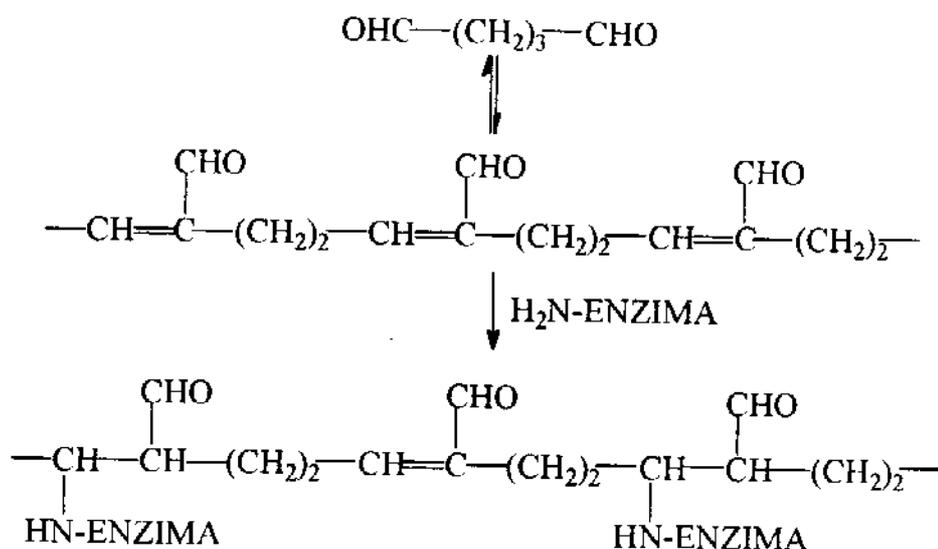
GRUPO	MATRIZ
Amino	α e β amino-grupos
Carboxílico	β e γ carboxil-grupos
Tiol	S-H cisteína
Hidroxila fenólica	tirosina
Imidazol	histidina
Hidroxila	serina

2.4 Imobilização por Ligação Covalente Cruzada

Nesta técnica, as moléculas da enzima ligam-se entre si por pontes intermoleculares, utilizando agentes bi ou multifuncionais. Alguns desses reagentes são: ácido bis-diazo benzidina, tolueno-2-isocianato-4-isotiocianato, glutaraldeído e vários outros do gênero.

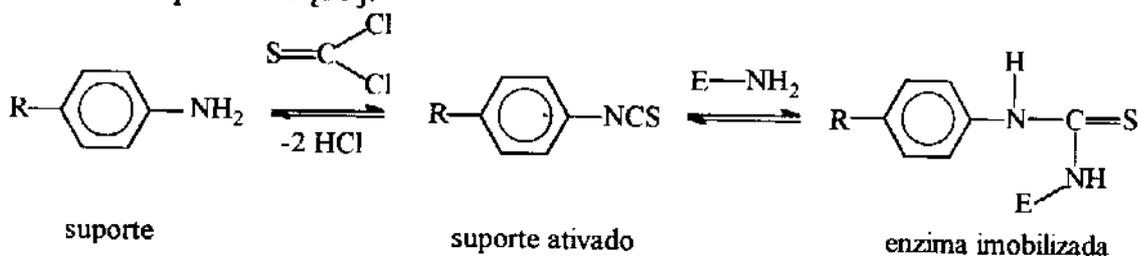
Dos reagentes polifuncionais, o glutaraldeído é o mais usado para esta técnica de imobilização, devido à baixa toxicidade e baixo custo quando comparado com os demais. As ligações formadas pela reação entre a enzima e glutaraldeído são irreversíveis com elevada resistência à variações de pH e temperatura. Tem sido sugerido que a reação com glutaraldeído mais provável envolve adição conjugada de amino-grupos da enzima à ligações etilênicas de oligômeros α,β -insaturados, contidos na solução aquosa de glutaraldeído comercialmente usada [46].

A reação entre o glutaraldeído e a enzima é mostrada a seguir:



Esta técnica propicia complexos de alta atividade e grande resistência à desnaturação, explicada por fenômenos de impedimento estérico. A maior desvantagem é que muitas enzimas são sensíveis à reação perdendo a atividade catalítica. Assim deve-se otimizar a quantidade de agente imobilizante para que o processo seja viável numa análise química.

A seguir é ilustrado um exemplo de pré-ativação de um suporte polimérico, entre uma variedade muito grande de reações de acoplamento, para minimizarem-se efeitos de inativação catalítica por efeito da imobilização enzimática posterior [35]:



2.5 Influência do uso de glutaraldeído como agente imobilizante de proteínas [47]

Um dos agentes de ligação entre-cruzada para estruturas protéicas mais disponíveis comercialmente, glutaraldeído (pentanodial), tem encontrado larga aplicação no uso de imobilização enzimática em suportes sólidos para biossensores, em reatores enzimáticos, em cromatografia por bioafinidade e em pesquisa de imunossensores químicos.

A efetividade da imobilização com glutaraldeído, GA, depende diretamente das condições experimentais em que tal procedimento é aplicado,

devido à multiplicidade das estruturas químicas possíveis em cada situação. Diferentes estudos tem mostrado que soluções aquosas de GA (25 ou 70 %) representam misturas de multicomponentes. O pH destas soluções é de aproximadamente 3,1 e pode ser explicado se alguns dos grupos aldeídicos são parcialmente oxidados aos ácidos carboxílicos correspondentes.

Análises por RMN-¹H indicaram algumas estruturas do GA em solução aquosa, ácida ou neutra: GA livre (I), linear- mono (II) e dihidratos (III), um hemiacetal cíclico (IV) e oligômeros (V), como é mostrado na FIGURA I, a seguir:

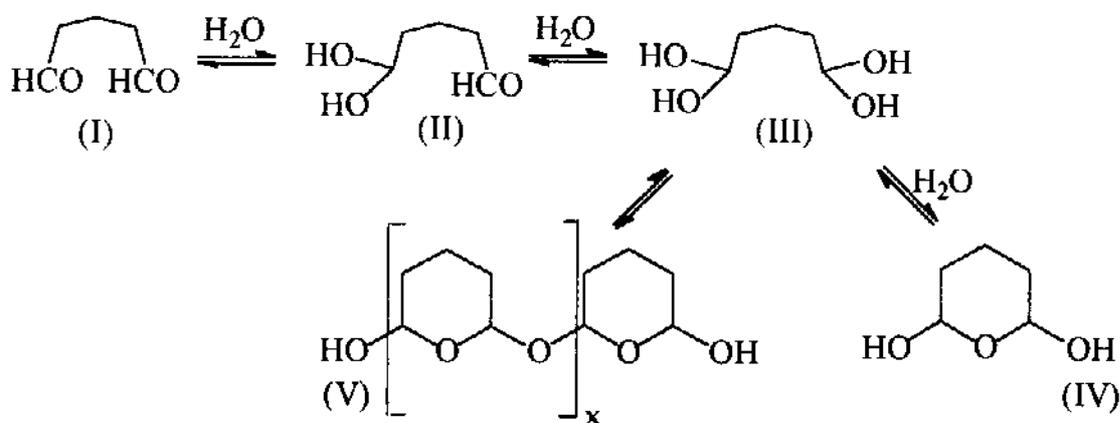


FIGURA I: Principais estruturas do GA em solução aquosa.

Todas as formas propostas para o GA podem reagir com proteínas formando produtos com estruturas monoméricas ou multiméricas.

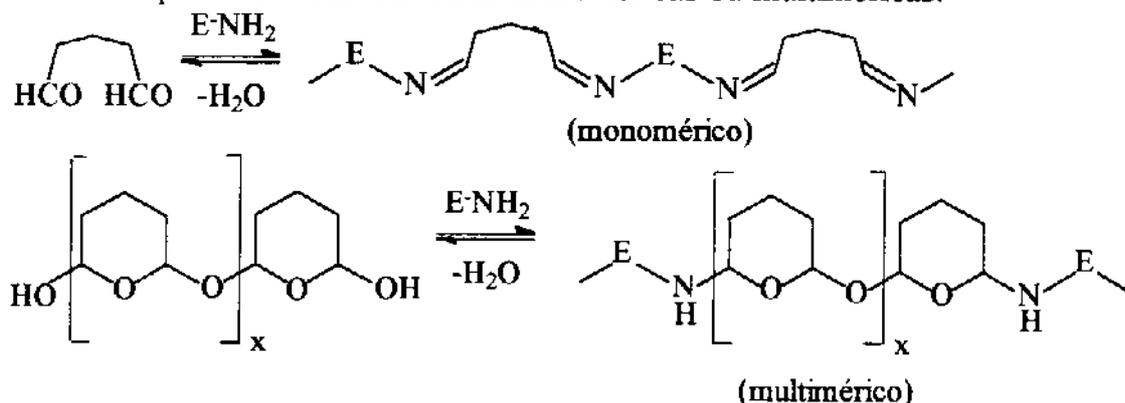


FIGURA II: Reações do GA com proteínas sob condições ácidas ou neutras.

Sob condições básicas, GA submete-se à condensações aldólicas para formar aldeídos multiméricos α,β -insaturados de estruturas complexas, que podem reagir com grupos protéicos através da formação de bases de Schiff estabilizadas.

As estruturas do GA polimérico em ambas as formas, linear ou cíclica, mostram melhores capacidades imobilizantes em relação ao produto puro, sendo que o uso de GA para imobilização enzimática torna-se específico para cada estrutura protéica em particular, bem como sua aplicação.

Após a imobilização enzimática apropriada, é necessário remover-se o excesso de GA não reagente, pelo uso de uma solução de glicina, para evitar-se problemas de interferência na determinação analítica; deve-se levar em conta ainda que um excesso de GA na solução pode reagir com o tampão usado, TRIS-HCl, ocasionando mudanças na força iônica da solução.

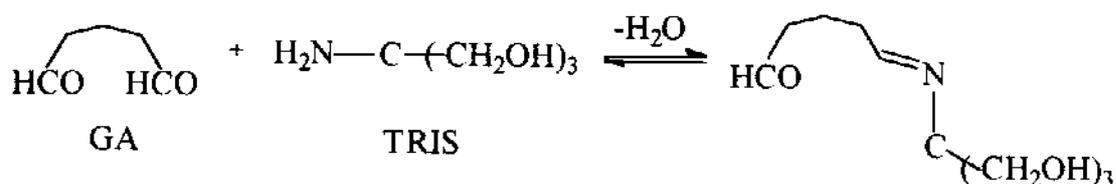


FIGURA III: Reação de acoplamento entre glutaraldeído e tris-(hidroximetil)-amino metano.

3. CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

Quando uma enzima é imobilizada, algumas de suas características podem alterar-se:

- 1) Estabilidade - a velocidade de desnaturação de uma enzima imobilizada é menor que a enzima livre, pois está protegida como se estivesse em seu meio natural;
- 2) Constante de Michaelis-Menten - geralmente há um aumento no valor de K_M devido à modificação na estrutura tridimensional da enzima, o que reflete diretamente no abaixamento da atividade catalítica;
- 3) pH - o pH ótimo para a atividade enzimática sofre uma mudança, podendo aumentar a faixa, onde não há perda de atividade da enzima imobilizada, em até uma unidade de pH.

Existe um incentivo para a conversão de enzimas solúveis em imobilizadas. O custo de uma enzima depende muito de sua obtenção. O custo de sua imobilização refere-se ao trabalho e custo químico, bem como a complexidade do método.

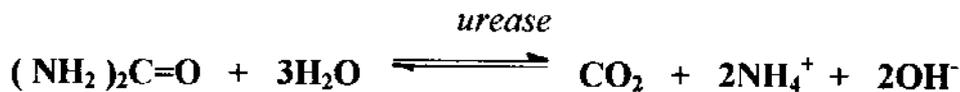
Assim, a relação custo-benefício é importante na implantação de qualquer metodologia analítica que se utilize de enzimas como reagentes.

CAPÍTULO VI

UREASE

1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA UREASE

A primeira enzima a ser isolada na forma pura por Sumner [48] foi a urease (uréia amido hidrolase E.C. 3.5.1.5) em 1926. É uma enzima de alto poder catalítico que catalisa a hidrólise da uréia em gás carbônico e íons amônio, em meio neutro, segundo:



A urease de soja apresenta massa molecular, expressa em g/mol, de $4,8 \times 10^5$, consistindo de duas moléculas enzimaticamente ativas de massa molecular $2,4 \times 10^5$, embora possa ser encontrada também em sementes de plantas, microorganismos e alguns invertebrados, com um alto grau de especificidade para uréia e derivados como hidroxí e di-hidroxí uréia.

Em solução neutra, na presença de dodecil sulfato de sódio a 1,0 %, ela se dissocia em 8 unidades (massa molecular = 60.000) compreendendo duas cadeias ligadas covalentemente (cada uma com massa molecular = 30.000), que ainda possuem atividade. A urease é resistente à desnaturação pelo seu próprio substrato, sendo capaz de desnaturar outras proteínas.

2. PRINCIPAIS FONTES DE UREASE

Em 1913, Marshal [49] primeiramente usou urease extraída de “jack bean” para dosar uréia em amostras de sangue e urina, seguindo um processo de aeração para o recolhimento e titulação da amônia resultante. Em 1909, porém, já se havia constatado a presença de urease em soja.

Machado [50] realizando estudos concluiu que as melhores fontes de urease naturais no Brasil são:

- 1) feijão de soja (*soja hypsida*);
- 2) semente de melancia (*citrullus vulgaris*);
- 3) feijão de porco ou “jack bean” (*canavalia ensiformis*);
- 4) abóbora moganga (*cucurbita maxima*).

Esta última apresenta a desvantagem de seus extratos desenvolverem rapidamente elevados teores de amônia, provavelmente devido a outros mecanismos enzimáticos como araginase, por exemplo.



Duas outras fontes também muito ricas em urease são as da família *canavalia*, porém de outros gêneros: a *canavalia marítima* e a *canavalia brasiliensis*, sendo esta última objeto de estudo deste trabalho.

3. ATIVADORES E INIBIDORES DA UREASE

Gorin [51] e colaboradores publicaram um artigo afirmando que os sítios ativos da urease são grupos sulfidríla. Assim, íons metálicos geralmente inativam a urease por reação com o grupo sulfidríla. Estudando-se a determinação potenciométrica direta do sistema uréia-urease sob condições experimentais controladas de pH, temperatura, concentrações de enzima e substrato, concluiu-se que Cu^{2+} e Zn^{2+} desativam a urease numa inibição não-competitiva, sendo o primeiro mais intenso devido ao menor valor do produto de solubilidade do sulfeto de cobre II.

Outros metais também se mostraram inibidores da urease como Hg^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} [52]. A amônia forma complexos com estes metais, muitos podendo ser removidos como hidróxidos ou precipitados em meio alcalino. Quando o íon HO^- está presente em concentração igual a 0,1 M e a amônia menor que $1,0 \times 10^{-3}$ M, só o cátion Hg^{2+} formará complexo com a amônia. Neste caso, íons iodeto são recomendados para evitar interferência pois formam complexos solúveis de Hg^{2+} em qualquer valor de pH. Íons Fe^{2+} e Mn^{2+} também agem como inibidores da urease, sendo inclusive determinados indiretamente por esta propriedade.

A complexação por um agente quelante como cianeto ou EDTA, pode eliminar interferências. A inibição da urease por metais é do tipo não-competitiva em meio alcalino, sendo que a velocidade reacional enzimática é inversamente proporcional à concentração do inibidor.

A atividade de enzimas imobilizadas tem sido restaurada quando tratadas com soluções de EDTA, ou tampões biológicos como o Tris-(hidroximetil)-amino metano, por exemplo.

A ativação da urease pelo fosfato (HPO_4^{2-}) foi observada por Fasman e Nieman [53], sendo possível que a espécie carbamil-fosfato seja um produto intermediário no mecanismo reacional da enzima com o substrato.

CAPÍTULO VII

BIOSENSORES

1. INTRODUÇÃO

O progresso da eletroquímica com eletrodos ion-seletivos e eletrodos voltamétricos tem sido expressivo em diagnósticos laboratoriais e pesquisas biológicas, fundamentalmente [41, 54].

A idéia inicial de usar-se uma enzima aliada a um eletrodo é atribuída a Clark e Lyons [55], em 1962, destinando-se à determinação de glicose. A técnica de então é a mesma adotada nos modernos analisadores comerciais: baseia-se na oxidação de glicose a ácido glicônico, envolvendo consumo de oxigênio e formação de peróxido de hidrogênio por ação da glicose-oxidase:



Embora seja possível medir a concentração de glicose, tanto pela quantificação de peróxido de hidrogênio produzido quanto pelo consumo de oxigênio (decréscimo na pressão parcial do gás), é a última alternativa geralmente usada: o eletrodo amperométrico de oxigênio.

Posteriormente estes dispositivos receberam a denominação de “Eletrodos Enzimáticos”. Contudo, com o desenvolvimento intensivo na busca de novos sensores físico-químicos, em especial, utilizando-se de reações enzimáticas variadas, foi introduzido um termo mais genérico e abrangente, o de “Biossensor”.

Assim, biossensor constitui-se de um elemento biológico com alguma propriedade capaz de quantificar uma determinada espécie (como tecidos, células, organelas, enzimas/cofatores, anticorpos, ácidos nucleicos e outros) e um elemento transdutor capaz de converter a resposta química em um sinal apropriado, podendo ser potenciométrico, amperométrico, condutométrico, óptico, calorimétrico (entalpimétrico), entre outros.

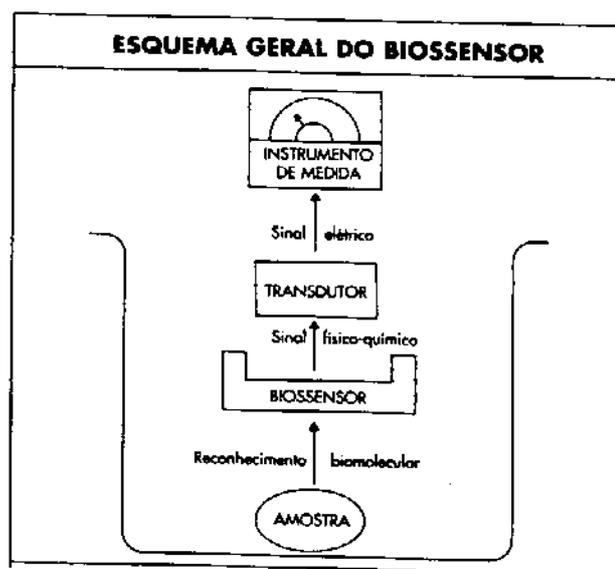


FIGURA I: Esquema geral de um biossensor - O elemento chave do dispositivo é a camada sensora, constituída por biomoléculas, geralmente enzimas, permitindo avaliar a concentração do componente químico contido na amostra [56].

Desenvolvidos em ambientes acadêmicos há cerca de trinta anos, esses dispositivos analíticos são pioneiros tanto em desenvolvimento quanto na produção em escala comercial. Os biossensores enzimáticos prestam-se atualmente a elevado número de determinações analíticas, em particular análises clínicas. A taxa sanguínea de glicose, informação vital ao controle da diabetes, é, sem dúvida, a principal aplicação atual.

Outros dispositivos similares são usados para a análise de uréia, ácido úrico, triglicerídios, colesterol, tirosina, oxalato, salicilato, creatinina, ascorbato, lisina, sacarose, lactato e penicilina, entre os principais metabólitos, cuja concentração plasmática, tecidual ou urinária seja relevante ao diagnóstico clínico.

O emprego industrial dos biossensores tende a crescer, em particular nas fábricas de alimentos e demais setores envolvidos, o que inclui a indústria farmacêutica (antibióticos) e o setor sucroalcooleiro.

2. PROPRIEDADES DOS BIOSSENSORES POTENCIOMÉTRICOS

As características mais importantes num biossensor potenciométrico são: a estabilidade, o tempo de resposta e a sensibilidade [35, 37].

2.1 Estabilidade

A estabilidade pode ser afetada por alguns fatores principais como:

2.1.1 Tipo de imobilização

Geralmente, um eletrodo com enzima solúvel, é usado por cerca de uma semana com 25 a 50 determinações sob determinadas condições e acondicionados, quando fora de uso, sob refrigeração.

Os eletrodos com enzimas imobilizadas fisicamente, são estáveis por 3 ou 4 semanas para cerca de 100 determinações, dependendo do grau de cuidado na preparação do polímero.

Imobilizações por métodos químicos apresentam-se mais estáveis e com vida útil maior, devido às ligações mais efetivas entre a enzima e o suporte, diminuindo a lixiviação da camada enzimática.

2.1.2 Quantidade e pureza da enzima

A estabilidade aumenta com a espessura da camada enzimática, porém, o tempo de resposta também eleva-se. Há uma quantidade crítica de enzima, pura ou de alguma fonte natural, para se obter uma resposta nernstiana. Às vezes é mais vantajoso aumentar a quantidade de enzima, principalmente quando esta não é purificada. Deve-se salientar também que quanto mais espessa a camada de enzima, mais difícil a difusão dos íons gerados no meio reacional até a membrana sensora.

2.1.3 Condições experimentais

As condições operacionais mais adequadas devem ser estudadas para otimizar-se a determinação analítica tais como pH, temperatura, tampão e força iônica da solução, concentração do substrato e outros.

Leva-se em conta também a estabilidade do sensor base quando se utilizam eletrodos com tempo de vida curto, como por exemplo, os de membrana líquida.

2.2 Tempo de resposta

O tempo de resposta do biossensor envolve a difusão do substrato através da membrana enzimática e a difusão do(s) produto(s) formado(s) até a superfície da membrana do sensor base, quando é, então, monitorado.

Os principais fatores que modificam o tempo de resposta são:

2.2.1 Velocidade de agitação

A velocidade de difusão do substrato é alterada pela agitação da solução afetando a resposta do eletrodo, o valor da diferença de potencial, a velocidade de transferência de massa de substrato para o eletrodo e também a velocidade de transferência de massa do produto para fora do eletrodo. Maior velocidade na agitação fornece potenciais mais reprodutíveis com menor tempo de resposta, desde que mantida constante.

2.2.2 Concentração da enzima

Um aumento na quantidade de enzima pode levar a um aumento no tempo de resposta do sensor. Isto se dá devido ao aumento na espessura da membrana, dificultando a difusão do substrato na mesma. É aconselhável a utilização de enzimas com alta atividade, permitindo a obtenção de membranas com a enzima imobilizada, as mais finas possíveis.

2.2.3 Membrana de diálise

Em muitos casos, é útil o uso de membranas de diálise que servem para proteger as enzimas prolongando a vida útil do biossensor. O tempo de resposta é modificado pela variação da espessura da membrana de diálise.

Guilbault [57], estudando o efeito da espessura dessas membranas, verificou que a membrana de celofane influenciava menos no tempo de resposta para eletrodo de uréia.

Deve-se notar que em eletrodos sensores a gases, como os de gás carbônico e amônia, o tempo de resposta depende da concentração da espécie monitorada, levando-se maior tempo para concentrações mais diluídas.

2.3 Sensibilidade

A sensibilidade de um biossensor depende diretamente da sensibilidade do sensor base utilizado.

Assim, deve-se não só escolher as condições operacionais adequadas para uma determinação analítica mas, principalmente o tipo de transdutor que

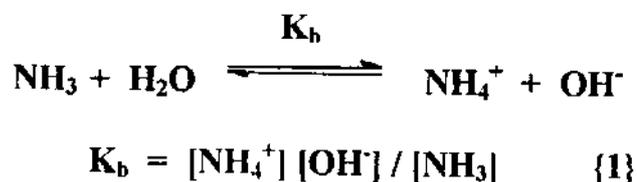
melhor desempenho possa fornecer, de acordo com o nível de concentração do analito necessária numa análise.

3. BIOSSENSORES PARA URÉIA

O primeiro biossensor potenciométrico para uréia [57] consistia de urease fisicamente imobilizada em gel de poli(acrilamida) na superfície de um eletrodo seletivo a íons amônio. Este eletrodo respondia à mudança na concentração de uréia entre 5×10^{-5} e 1×10^{-1} M, com tempo de resposta de cerca de 35 segundos e tempo médio de vida de 14 dias. O uso de um filme de celofane sobre o sensor com a enzima imobilizada aumentou o tempo de vida para 3 semanas.

Muitos eletrodos sensores a gás amônia são também usados para a determinação de uréia. A amônia gerada na hidrólise enzimática desse substrato difunde-se através de uma membrana de permeação apropriada até que a pressão parcial do gás seja a mesma em ambos os lados da membrana, sendo que a pressão parcial da amônia é proporcional à sua atividade.

Dentro destes sensores existe uma solução de referência interna contendo cloreto de amônio em concentração suficiente para ser considerada fixa, onde a amônia difundida pela membrana sofre hidrólise:



Como a concentração de íons amônio é considerada fixa:

$$[\text{OH}^-] = [\text{NH}_3] K_b \quad \{2\}$$

O potencial do eletrodo sensível à amônia varia de maneira nernstiana com mudança na concentração de íons hidroxila e o eletrodo responde à atividade da amônia:

$$E = E' - \frac{RT}{F} \ln a(\text{NH}_3) \quad \{3\}$$

De forma semelhante, eletrodos sensores a gás carbônico também são usados para quantificar uréia. A solução de referência interna é bicarbonato de sódio e o potencial deste eletrodo varia com a mudança de pH da solução interna, proporcionalmente à concentração inicial de uréia.

A grande vantagem desses eletrodos está na grande redução de interferentes presentes em amostras de uréia, porém, o tempo de resposta é relativamente longo sobretudo para concentrações muito diluídas de substrato.

Guilbault e colaboradores [16] desenvolveram um eletrodo íon-seletivo para amônio usando borracha de silicone como suporte e nonactin como trocador neutro. O coeficiente de seletividade potenciométrico foi de $6,5 \times 10^{-1}$ para íons potássio e de $7,5 \times 10^{-2}$ para íons sódio, apresentando resposta lenta, devido à velocidade reduzida de difusão do substrato pela membrana. Para evitar a interferência desses íons, Guilbault e Hrabankova [15] usaram uma resina de troca iônica com sensibilidade até 10^{-6} M e precisão de cerca de 3 %.

Um outro biossensor potenciométrico específico para uréia foi descrito por Mascini [17] com a urease imobilizada quimicamente com glutaraldeído e albumina de soro bovino numa membrana de teflon, com tempo de resposta de 2 minutos e coeficiente de Nernst de 55,0 mV/ década para concentração entre 1×10^{-4} e 5×10^{-3} M (cerca de 20 determinações por hora com excelente correlação).

A uréia é, por vezes também, determinada amperometricamente com a urease imobilizada em PVA e presa numa membrana de diálise a um eletrodo de platina. A dependência do pH na oxidação da hidrazina naquele eletrodo é usada para monitorar a reação. A relação entre corrente e concentração em soluções alcalina e ácida mostra-se linear na faixa de 1 a 80 mM em uréia [35].

3.1 Revisão Bibliográfica

Com o crescente desenvolvimento na área de biossensores, vários artigos tem sido publicados nos últimos anos, procurando sempre elaborar métodos de análise química os mais viáveis possíveis, no sentido de obterem-se resultados analíticos mais precisos e exatos, levando-se em conta a frequência de amostragem, a rapidez e a melhor relação custo-benefício em determinações analíticas, além da necessidade atual em se mensurar quantidades cada vez menores de espécies químicas.

Assim, foi feita uma pesquisa bibliográfica das publicações mais recentes na área da determinação enzimática da uréia, comparativamente ao projeto desenvolvido, usando um biossensor potenciométrico para esta quantificação. Procurou-se selecionar alguns textos mais relevantes que contribuíram de certa forma para o progresso do presente trabalho.

Como neste capítulo foi abordado o tema Biossensores, julgou-se conveniente adicionar esta revisão bibliográfica neste ponto da dissertação.

Alternativamente ao uso de enzimas em sua forma pura, tem-se procurado desenvolver métodos enzimáticos para a determinação de alguns substratos, utilizando-se de fontes naturais contendo teores de enzimas potencialmente viáveis em química analítica.

Silva e colaboradores [58], trabalhando com a leguminosa *canavalia marítima*, propuseram a determinação de uréia em amostras sorológicas, usando eletrodo sensor a gás amônia e imobilizando o material enzimático com glutaraldeído sobre a superfície do eletrodo, apropriadamente. O desempenho analítico do biossensor para esta quantificação é comparável ao método espectrofotométrico usado. São realizadas pelo menos 150 análises na faixa de concentrações de uréia de 0,25 a 9,5 mM com ótima correlação. O tempo de resposta do biossensor é de 5 minutos, a 25,0 °C, em tampão TRIS-HCl 0,1 M e pH=7,0.

Deng e colaboradores [59] utilizaram feijão-soja como fonte natural de urease na determinação de uréia. É feito um estudo minucioso de 5 espécies diferentes de feijões, usando eletrodos sensores a gás carbônico e amônia; são também comparados os efeitos de alguns sistemas-tampão, dos próprios eletrodos utilizados e da quantidade de glutaraldeído usada na imobilização do pó das leguminosas, na otimização da resposta do biossensor. O sistema apresenta melhor desempenho com eletrodo sensor a gás amônia, na faixa de concentrações de uréia entre 0,13 e 10 mM (coeficiente angular de Nernst de 58,1 mV/década de concentração) e tempo de resposta entre 2 e 6 minutos, em tampão TRIS-HCl 0,2 M e pH=9,0.

O uso de urease em sua forma pura (elevada atividade enzimática), na determinação potenciométrica de uréia, é muito empregada também associada a eletrodos ion-seletivos a amônio, baseados em ionóforos, embora seu custo, às vezes, seja elevado. Porém, a enzima é usada em sua forma cristalina quando se deseja aumentar o tempo de resposta do biossensor, pois durante o processo de imobilização, parte da atividade catalítica é perdida. Tem sido propostos métodos onde a enzima é associada a filmes poliméricos condutores como o polipirrol, onde ambos são fixos por meio de polimerização galvanostática. Respostas nernstianas são observadas para uma faixa de concentração de uréia entre 0,5 e 100 mM, com tempo de resposta inferior a 1 minuto [60,61].

Atualmente, com o desenvolvimento das fibras ópticas, vários biossensores ópticos têm sido preparados para determinar-se uréia enzimaticamente. Para medir-se o substrato opticamente, a produção ou o consumo de espécies químicas são usualmente monitorados fotometrica ou fluorimetricamente durante a reação enzimática. Estes sistemas apresentam-se precisos, porém são, na maioria das vezes, complexos e dispendiosos [62,63].

Áreas promissoras para a aplicação de biossensores envolvem o uso de sistemas FIA (Flow Injection Analysis) [64], onde é possível reduzir-se

sensivelmente interferência analítica, quando se trabalha com eletrodos íon-seletivos, principalmente, e também a miniaturização desses elementos [65].

Joseph [66] construiu um microeletrodo para amônia tipo “air gap” com 10 μm de diâmetro, obtendo resposta entre 35 e 45 segundos, para concentração de uréia entre 1×10^{-4} e 1×10^{-2} M, e tempo de vida de uma semana.

CAPÍTULO VIII

CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DO ELETRODO ÍON-SELETIVO A AMÔNIO UTILIZANDO-SE O IONÓFORO NONACTIN

1. INTRODUÇÃO

Com base nos diferentes artigos publicados, sobre a preparação de eletrodos sensíveis a amônio, NH_4^+ , construíram-se unidades, sem solução de referência interna, baseadas num ionóforo para metais alcalinos com elevada seletividade para NH_4^+ [2]. Este ionóforo constitui-se de um antibiótico macrotetrólito denominado nonactin com alta afinidade pelo íon de interesse.

Os eletrodos foram construídos sem solução de preenchimento seguindo o processo descrito por Costa Lima e colaboradores [67], utilizando-se como solvente, denominado genericamente de plastificante, o composto bis-2-(etil hexil)-adipato. Outros plastificantes foram usados segundo a referência anterior, como 2-nitro-fenil-octil éter, di-butil sebacato e tris-2-(etil-hexil)-fosfato, porém, não apresentando resultados reprodutíveis para o sensor estudado.

Efetuarão-se ensaios de avaliação das características gerais de funcionamento desses eletrodos, tais como:

- 1) limite nernstiano;
- 2) coeficiente angular de Nernst por década de concentração;
- 3) influência do pH no potencial dos eletrodos;
- 4) velocidade de resposta;
- 5) extensão da interferência analítica para alguns cátions mais comuns;
- 6) tempo de vida do eletrodo assim preparado.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais e Reagentes

Para a preparação da mistura sensora foram usados reagentes de qualidade p.a.-Fluka: ionóforo para amônio I (Ref. 098779), bis-2-(etil hexil)-adipato (Ref. 02138), PVC de massa molecular elevada (Ref. 81392) e pó de grafite, 2,0 μm (Ref. 50870). A leguminosa *canavalia brasiliensis* foi

fornecida pela Prof. Valdimete L. da Silva, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco.

As soluções de cloreto de amônio, usadas nos ensaios de calibração do eletrodo, foram preparadas em tampão TRIS-HCL 0,2 M - pH=6,8, contendo EDTA em concentração de 10^{-3} M.

Na calibração do eletrodo, tomou-se a faixa de concentrações de 10^{-6} a 1,0 M em cloreto de amônio; nos ensaios de interferência, utilizou-se cloretos de alguns metais alcalinos e alcalino-terrosos em concentração fixa de 10^{-3} M, juntamente com o íon primário, sendo todos os reagentes usados de grau analítico.

As medidas das diferenças de potencial foram obtidas com um pH/Analisador de íons Radelkis OP-271 ($\pm 0,1$ mV); as soluções foram mantidas a 25,0 °C num banho de termostatização Colora tipo KT 10K ($\pm 0,1$ °C).

Como referência, usou-se um eletrodo de Ag/AgCl // KCl 4 M, sat.com AgCl // $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M (dupla junção) OP-0820P, um sensor de temperatura OP-0003P e um eletrodo de vidro para medidas de pH OP-0808P, todos da marca Radelkis.

2.2 Construção do Eletrodo Base

Preparou-se a mistura sensora pesando-se o ionóforo ($\pm 0,01$ mg) e juntando-lhe o plastificante numa quantidade tal que originasse uma solução límpida, contendo 3,0 % de ionóforo para amônio e 97,0 % do solvente plastificante.

Para a preparação das membranas, foi adicionado à mistura sensora, PVC de massa molecular elevada previamente dissolvido em tetra-hidro furano, THF, a 5,0 % (m/V), numa proporção de 30,0 % da solução de PVC em THF e 70,0 % da mistura sensora preparada anteriormente.

As membranas foram aplicadas diretamente sobre o suporte condutor do eletrodo, constituído por uma mistura de Araldite[®] tornada condutora com pó de grafite, resultando numa película de cerca de 2 mm de espessura.

Após a secagem das membranas, durante pelo menos 24 horas, os eletrodos foram postos a condicionar numa solução de cloreto de amônio 0,1 M. Enquanto as unidades encontravam-se fora de uso, eram mantidas na mesma solução de condicionamento para evitar ressecamento e perda de sua atividade, frente ao íon de interesse.

O corpo do eletrodo base constitui-se de um cilindro oco de material polimérico inerte, com 13,0 cm de comprimento e 1,0 cm de diâmetro externo, dentro do qual acoplou-se um fio com blindagem apropriada ligado ao suporte condutor, situado na extremidade inferior do eletrodo. Sobre este suporte é aplicada a mistura sensora para íons NH_4^+ , como ilustrado na FIGURA I:

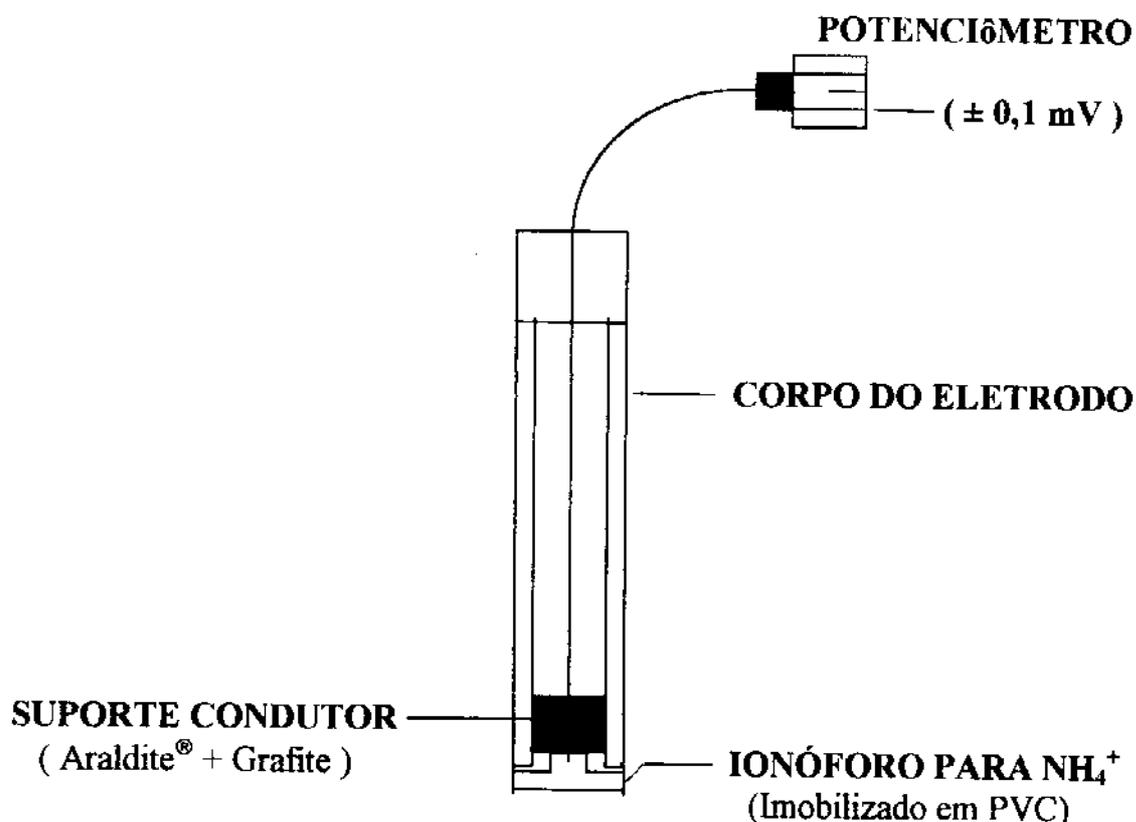


FIGURA I: Esquema do eletrodo base, seletivo a íons amônio, usado na determinação enzimática de uréia, posteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES:

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO ELETRODO

3.1 Parâmetros de Calibração

Foram obtidas as curvas de calibração típicas para o eletrodo construído, em soluções de cloreto de amônio sem a força iônica ajustada (água deionizada) e com a força iônica ajustada a 0,2 M com tampão TRIS-HCl, $\text{pH}=6,8$. A escolha do tampão como ajustador de força iônica foi feita, levando-se em conta a determinação enzimática de uréia que necessita de um tampão biológico adequado à reação e também devido aos valores obtidos para

os coeficientes de seletividade potenciométricos para alguns cátions comumente usados no ajuste de força iônica, mas que apresentaram interferência analítica considerável no sistema estudado.

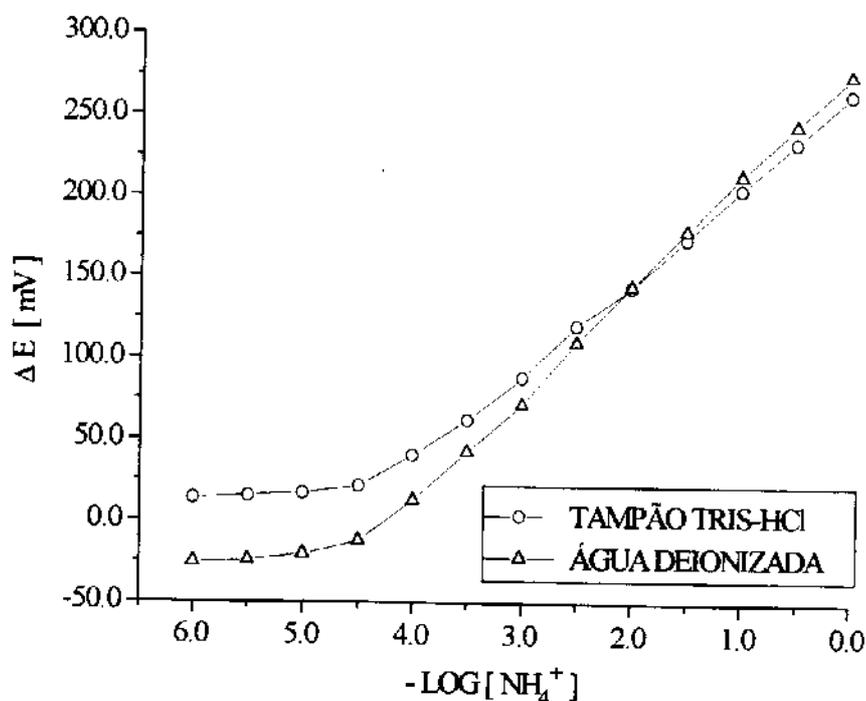


FIGURA II: Curvas de calibração típicas para NH_4Cl ($T=25,0^\circ\text{C}$) obtidas em água deionizada e em tampão TRIS-HCl 0,2 M ($\text{pH}=6,8$).

Verificou-se que o eletrodo construído apresentou resposta nernstiana de 56,4 mV/ década de concentração com boa correlação ($r = 0.9994$) na faixa de concentrações de $1,2 \times 10^{-4}$ a 1,0 M em íons NH_4^+ , com a força iônica ajustada e potenciais bastante reprodutíveis. Sem o controle da força iônica da solução, o sistema apresentou resposta super-nernstiana de 66,4 mV/ década de concentração e com maior tempo na estabilização dos potenciais obtidos.

3.2 Tempo de Resposta

O eletrodo foi inicialmente introduzido na solução de íons NH_4^+ com concentração de 10^{-5} M, registrando-se o potencial. Após sua estabilização, aumentou-se em uma década de concentração o nível de íons amônio, verificando o tempo necessário à nova estabilização do potencial.

Utilizando-se soluções de amônio em tampão TRIS-HCl 0,2 M - $\text{pH} = 6,8$, obteve-se um tempo de resposta sempre inferior a 10 segundos para a

estabilização do potencial, após ter-se alterado a concentração de amônio; no caso das soluções sem o controle da força iônica, o tempo de estabilização subia para 45 segundos, principalmente para soluções mais concentradas.

Estes valores são muito bons levando-se em conta que a quantidade do íon principal era sempre alterada de uma década de concentração.

3.3 Influência do pH

Estudou-se a influência do pH nos valores de potencial do eletrodo, quando este era posto em soluções de amônio, com concentrações de 10^{-2} e 10^{-4} M, sem controle de força iônica.

Utilizando-se respectivamente, HCl concentrado e NaOH, convenientemente preparados para provocar as alterações de pH, obtiveram-se os correspondentes diagramas de Reilley para o eletrodo construído.

Obteve-se uma faixa de valores de pH na qual o eletrodo não registrou variações significativas de potencial em função do pH (patamar operacional). O eletrodo mostrou resposta estável na faixa de pH entre: 2,5 - 8,0 ($[\text{NH}_4^+] = 10^{-4}$ M) e 4,0 - 7,0 ($[\text{NH}_4^+] = 10^{-2}$ M).

Esta faixa de trabalho em que o eletrodo pode atuar sem perder suas características, deve-se principalmente ao fato de se usar um trocador neutro como ionóforo, não tendo a constante de equilíbrio, entre o trocador e o íon de interesse, afetada pelo ambiente químico em que se encontra. Assim, o eletrodo resiste quimicamente ao meio, o que pode ser útil em alguns casos onde a amostra necessitaria sofrer um pré-tratamento antes de ser analisada.

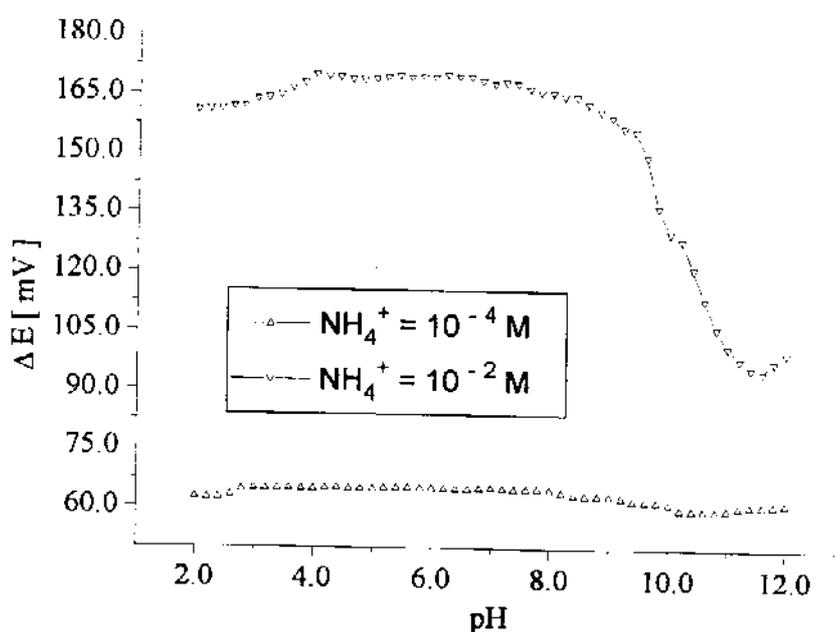


FIGURA III: Diagramas de Reilley para o eletrodo ion-seletivo a amônio construído.

3.4 Interferência Analítica

Foram determinados os coeficientes de seletividade potenciométricos, $K^{\text{POT}}_{\text{NH}_4^+, \text{MZ}^+}$, para alguns cátions interferentes mais comuns pelo método das soluções misturadas.

Neste método, conforme já descrito anteriormente, manteve-se a concentração do ion interferente fixa em 10^{-3} M , variando-se a concentração do ion principal, amônio, obtendo-se devidamente as diferenças de potencial relacionadas. Os valores de $K^{\text{POT}}_{\text{NH}_4^+, \text{MZ}^+}$ foram obtidos por extrapolação das curvas de calibração típicas para cada interferente, conforme mostrado nas FIGURAS IV e V. Os níveis de interferência dos íons estudados são dados a seguir:

TABELA I: Coeficientes de Seletividade Potenciométricos para o eletrodo baseado em macrotetrólito nonactin (em soluções a 10^{-3} M de cloretos de alguns metais interferentes). $T = 25,0$ °C.

ÍON INTERFERENTE	$K_{NH_4^+, MZ^+}^{POT}$
POTÁSSIO, K^+	$1,3 \times 10^{-1}$
RUBÍDIO, Rb^+	$7,9 \times 10^{-2}$
LÍTIO, Li^+	$7,4 \times 10^{-2}$
SÓDIO, Na^+	$3,7 \times 10^{-2}$
MAGNÉSIO, Mg^{2+}	$3,4 \times 10^{-2}$
CÁLCIO, Ca^{2+}	$2,7 \times 10^{-2}$

Os dados mostram uma grande interferência de íons K^+ sobre o eletrodo preparado. Isto é explicado pelo fato de tanto K^+ como NH_4^+ possuírem raios iônicos semelhantes, permitindo que sejam complexados pelo ionóforo nonactin competitivamente.

Os raios iônicos do NH_4^+ e do K^+ são respectivamente, 1,43 Å e 1,33 Å. Desta forma, o eletrodo acaba respondendo tanto para o íon primário quanto para a espécie interferente; à medida que se aumenta a atividade de NH_4^+ comparativamente à concentração fixa de K^+ , o eletrodo mostra-se mais seletivo ao íon de interesse, respondendo exclusivamente a ele.

Os demais íons monovalentes já apresentaram menor nível de interferência comparados com o K^+ . Os íons cálcio e magnésio possuem características estruturais diferentes do íon NH_4^+ , apresentando um nível de interferência menor; leva-se em conta ainda que trabalha-se num meio tamponado contendo o quelante EDTA, que complexa parte desses íons diminuindo sua interferência ainda mais.

Uma referência muito interessante [68] mostra o nível de interferência obtido para um microeletrodo íon-seletivo a íons amônio baseado numa mistura de antibióticos - nonactin e monactin - com os valores de seletividade potenciométrica dados a seguir:

TABELA II: Coeficientes de Seletividade Potenciométricos para microeletrodo de membrana sólida, com valores obtidos pelo método das soluções separadas, em cloretos de alguns metais interferentes a 0,1 M, em meio não tamponado (T = 25,0 °C):

ÍON INTERFERENTE	- LOG K ^{POT} _{NH₄⁺, MZ⁺}
HIDROGÊNIO, H ⁺	2,2
LÍTIO, Li ⁺	3,6
SÓDIO, Na ⁺	2,0
POTÁSSIO, K ⁺	0,6
RUBÍDIO, Rb ⁺	0,9
CÉSIO, Cs ⁺	1,7
MAGNÉSIO, Mg ²⁺	4,4
CÁLCIO, Ca ²⁺	4,2
ESTRÔNCIO, Sr ²⁺	4,1
BÁRIO, Ba ²⁺	3,8
TETRAMETIL-AMÔNIO, TMA ⁺	1,8
ACETIL COLINA, AcCo ⁺	1,9
MANGANÊS, Mn ²⁺	3,8
COBALTO, Co ²⁺	3,7

Observa-se pelos valores da TABELA II, uma coerência entre os resultados obtidos, apesar de ter-se usado métodos diferentes para o cálculo do coeficiente de seletividade, indicando que realmente os íons potássio e rubídio interferem de maneira acentuada na resposta do eletrodo.

As curvas de calibração típicas para o cálculo de K^{POT}_{NH₄⁺, MZ⁺}, para os íons interferentes estudados são dadas a seguir:

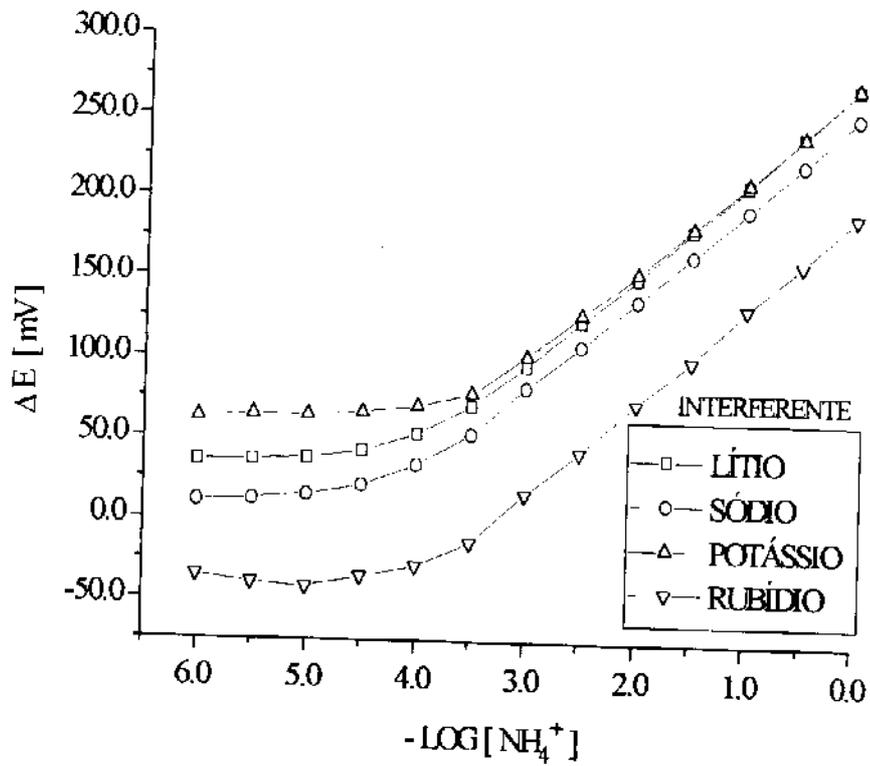


FIGURA IV : Curvas de calibração típicas obtidas para o cálculo do coeficiente de seletividade para íons monovalentes. Tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH = 6,8 (T= 25,0 °C). Concentração do ion interferente = 10⁻³ M.

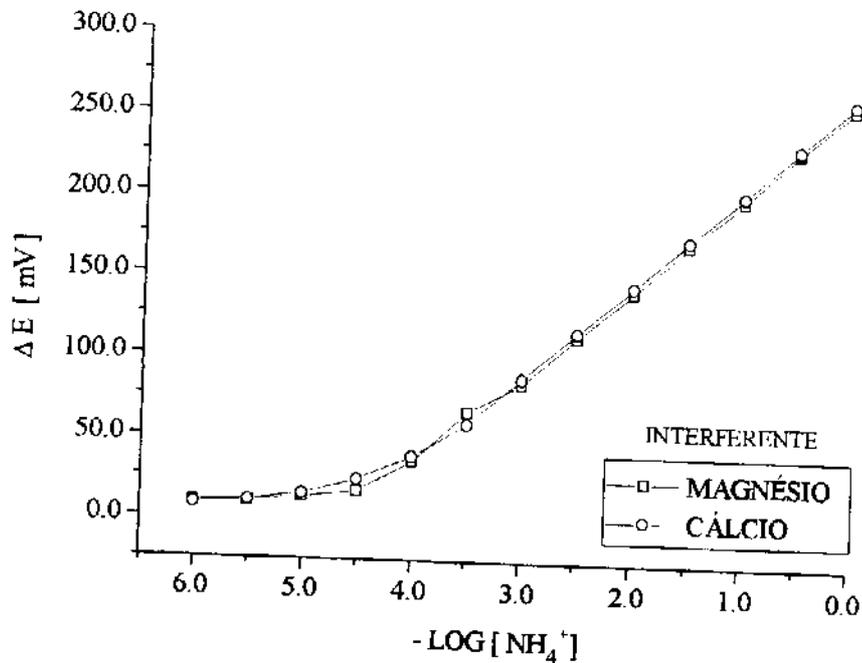


FIGURA V: Curvas de calibração típicas obtidas para o cálculo do coeficiente de seletividade para íons bivalentes. Tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH = 6,8 (T = 25,0 °C). Concentração do íon interferente = 10⁻³ M.

3.5 Tempo de Vida

O tempo de vida útil para o sensor potenciométrico foi avaliado desde sua construção em Maio de 1993 até Dezembro de 1994, através de curvas de calibração mensais. Neste período, não registraram-se diferenças significativas em seu desempenho analítico.

Além da verificação mensal da atividade do eletrodo, o mesmo foi usado nos estudos envolvendo a determinação enzimática de uréia, apresentando sempre um comportamento nemstiano com boa correlação, na faixa de concentrações de íons amônio entre 10⁻⁴ e 1,0 M.

Pela TABELA III, pode-se notar que o eletrodo construído é bastante estável química e mecanicamente, exibindo resposta nemstiana a íons amônio, mesmo após um ano de sua confecção; isto se deve em parte à simplicidade do sensor que não requer solução de preenchimento sendo robusto e de fácil manipulação.

Assim, a membrana sensora, nonactin suportado em PVC de massa molecular elevada, também mostra-se resistente desde que acondicionada de forma conveniente, quando fora de uso.

O eletrodo construído foi guardado em recipiente plástico contendo uma solução 0,1 M em íons amônio, sem refrigeração, para evitar-se o ressecamento da membrana com perda da atividade do eletrodo.

TABELA III: Avaliação do tempo de vida útil do eletrodo potenciométrico para íons amônio:

MÊS / ANO	COEFICIENTE ANGULAR DE NERNST, [mV]	COEFICIENTE CORRELAÇÃO, r
MAIO/93	59,0	0,9996
JUNHO/93	58,5	0,9999
JULHO/93	58,6	0,9999
AGOSTO/93	58,8	0,9998
SETEMBRO/93	58,9	0,9998
OUTUBRO/93	58,7	0,9999
NOVEMBRO/93	57,3	0,9997
DEZEMBRO/93	58,8	0,9996
JANEIRO/94	57,1	0,9997
FEVEREIRO/94	57,3	0,9996
MARÇO/94	56,8	0,9998
ABRIL/94	57,7	0,9996
MAIO/94	55,2	0,9996
JUNHO/94	56,2	0,9992
JULHO/94	55,8	0,9996
AGOSTO/94	55,8	0,9998
SETEMBRO/94	56,4	0,9993
OUTUBRO/94	57,9	0,9996
NOVEMBRO/94	57,5	0,9995
DEZEMBRO/94	57,0	0,9993
média (\pm d.p.r.) = (57,5 \pm 1,8) mV		

d.p.r. = estimativa do desvio padrão relativo.

CAPÍTULO IX

CARACTERIZAÇÃO DA UREASE PROVENIENTE DA FONTE VEGETAL *CANAVALLIA BRASILIENSIS*

1. INTRODUÇÃO

Diferentemente do encontrado para as leguminosas *canavalia ensiformis* e *canavalia marítima* [58], verificou-se que a atividade enzimática da *canavalia brasiliensis* era superior às anteriores, optando-se pela utilização desta última como fonte natural de urease na determinação potenciométrica de uréia.

Utilizando-se a leguminosa na forma bruta, sem casca, triturada em almofariz de porcelana e passadas em peneira de malha 80 (80 mesh), estudaram-se alguns parâmetros bioquímicos mais importantes tais como:

- 1) as influências do pH, da quantidade de material enzimático, da temperatura e do tempo de resposta na cinética enzimática envolvida;
- 2) determinação da atividade enzimática de urease presente na fonte vegetal (método potenciométrico);
- 3) a determinação dos valores da constante de Michaelis-Menten e a velocidade inicial máxima de reação para o sistema uréia-urease.

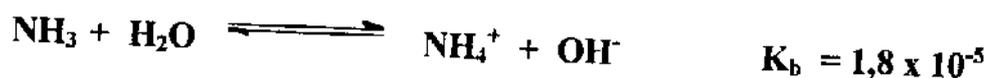
Nestas determinações, usou-se o próprio eletrodo íon-seletivo a amônio construído, monitorando-se sempre a quantidade de íons NH_4^+ formados pela hidrólise enzimática da uréia, nas condições experimentais apropriadas onde o eletrodo exibiu resposta nernstiana (faixa operacional).

2. RESULTADOS E DISCUSSÕES: DESEMPENHO DO SENSOR POTENCIOMÉTRICO USANDO *CANAVALIA BRASILIENSIS* EM SUSPENSÃO COMO FONTE ENZIMÁTICA PARA URÉIA

2.1 Influências do pH e do sistema tampão

A escolha do pH e da solução tampão no ajuste de força iônica, foi feita levando-se em conta dois fatores principais:

a-) o tipo de sensor usado na determinação de uréia - como foi empregado um eletrodo íon-seletivo a NH_4^+ , o pH do sistema não poderia ser superior a 7,0 pois isto levaria a uma diminuição da quantidade de íons amônio, na forma de amônia, para a qual o eletrodo não responde, segundo o equilíbrio:



Além disso, evitou-se o uso de sistemas-tampão envolvendo íons como por exemplo, tampão fosfato (KH_2PO_4 - NaOH), devido à interferência analítica verificada para o eletrodo construído, constatada pelos valores de coeficiente de seletividade potenciométricos.

b-) a atividade da enzima - como a faixa de pH, na qual tem-se atividade enzimática máxima, é restrita devido a problemas de desnaturação protéica, e que, utilizou-se não a enzima na forma pura mas sim uma fonte natural, verificou-se que o valor de pH não poderia ser muito menor que 6,5, como já discutido no capítulo IV, figura V.

Desta forma, optou-se pelo uso de um sistema-tampão biológico, o Tris-(hidroximetil)-amino metano, TRIS-HCl, em concentração de 0,2 M, para minimizar-se efeitos de interferência, e um valor de $\text{pH} = 6,8$, onde o sistema potenciométrico respondeu adequadamente na determinação de uréia.

2.2 Influência da quantidade de material enzimático

Quantidades de *canavalia brasiliensis*, em pó, que variaram de 2,0 a 7,0 mg por mL de substrato, foram termostatizadas a 25,0 °C em tampão TRIS-HCl 0,2 M - $\text{pH}=6,8$. Obtiveram-se as curvas de calibração típicas para cada concentração enzimática na faixa de concentrações de uréia entre 10^{-4} e 10^{-2} M.

A FIGURA I ilustra os resultados obtidos tomando-se como parâmetro comparativo o coeficiente angular de Nernst, por década de concentração, assim determinado pelas curvas de calibração.

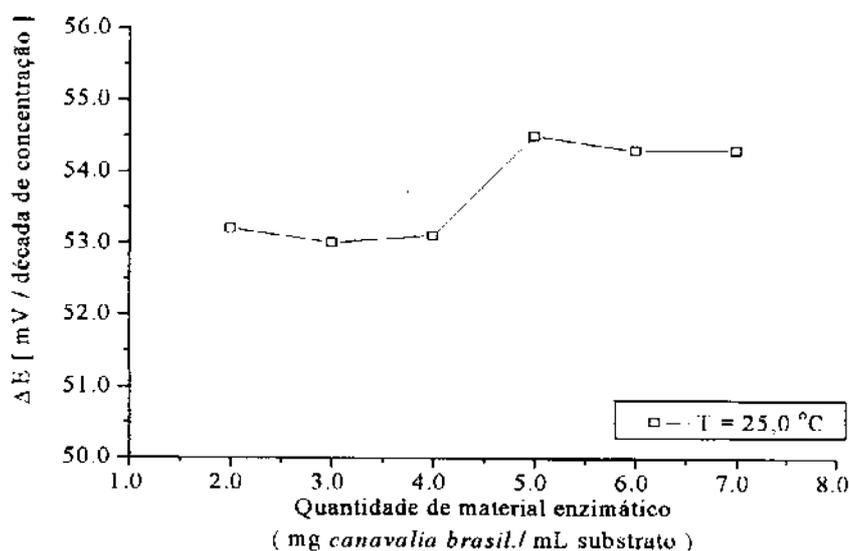


FIGURA I: Resposta analítica do sensor potenciométrico variando-se a quantidade de material enzimático empregado. Aliquotas de 10,0 mL de solução de uréia em tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH=6,8.

De acordo com a equação de Michaelis-Menten, observa-se um aumento na velocidade reacional quando se aumenta a concentração de enzima, porém, este aumento cessa para concentrações mais elevadas da mesma. Deve-se levar em conta também as limitações do método de detecção usando-se para tal fim, um eletrodo íon-seletivo a amônio, o que não significa queda na atividade do material enzimático ou saturação da enzima com seu substrato.

Assim, verifica-se uma quantidade ideal, para a obtenção de resposta nernstiana, de 5,0 mg/mL de substrato, onde é possível quantificar-se potenciometricamente o teor de uréia nas condições experimentais anteriormente descritas.

2.3 Influência da temperatura

Foram adicionados 50,0 mg do pó da leguminosa, devidamente triturados, em aliquotas de 10,0 mL de uréia em concentrações variando entre 10^{-4} e 10^{-2} M, em tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH = 6,8. Obtiveram-se as curvas de calibração para temperaturas entre 20,0 e 35,0 °C, novamente verificando o melhor desempenho nernstiano do eletrodo para a concentração agora fixada de enzima.

A FIGURA II ilustra melhor a dependência da reação enzimática com a temperatura.

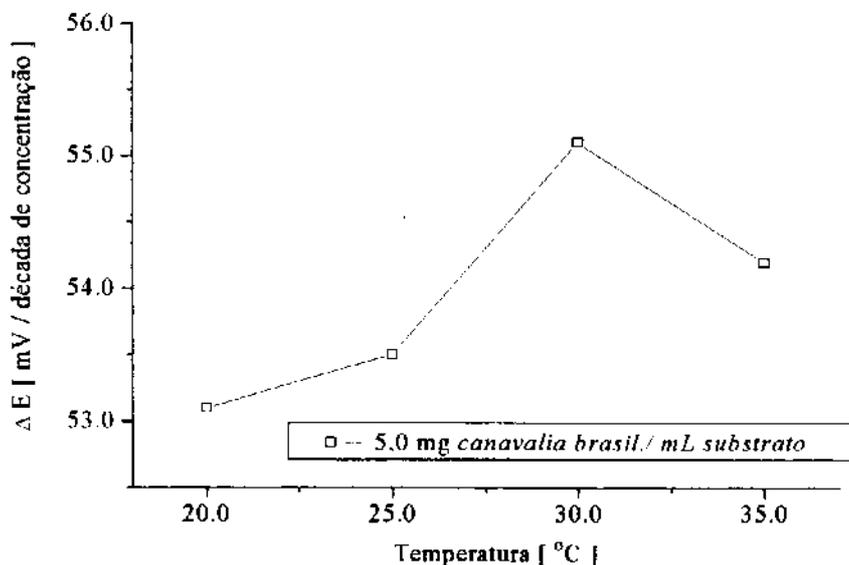


FIGURA II: Resposta do sensor potenciométrico para diferentes temperaturas usadas na reação enzimática. Aliquotas de 10,0 mL de soluções de uréia em tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH=6,8.

Observa-se, pelos dados obtidos, que um aumento na temperatura de reação leva a um aumento na velocidade reacional enzimática, porém, causando perda da atividade catalítica em temperaturas mais elevadas. Assim, escolheu-se a temperatura de 30,0 °C para a determinação enzimática de uréia.

É possível também que haja uma diminuição na atividade da membrana do eletrodo potenciométrico (sensor base), que não mais responde de forma nernstiana frente ao íon amônio, quando se eleva a temperatura, com diminuição de seu desempenho analítico.

2.4 Influência da concentração de enzima no tempo de resposta

Quantidades de material enzimático variando de 4,0 a 16,0 mg/mL de substrato, foram termostatizadas a 25,0 °C em tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH=6,8. Para concentrações de uréia variando entre 0,57 e 280 mM, foram obtidas curvas de diferença de potencial versus tempo, monitorando-se a quantidade de íons amônio formados na degradação enzimática desse substrato com o eletrodo construído.

As curvas de potencial versus tempo são mostradas nas FIGURAS II, III, IV e V.

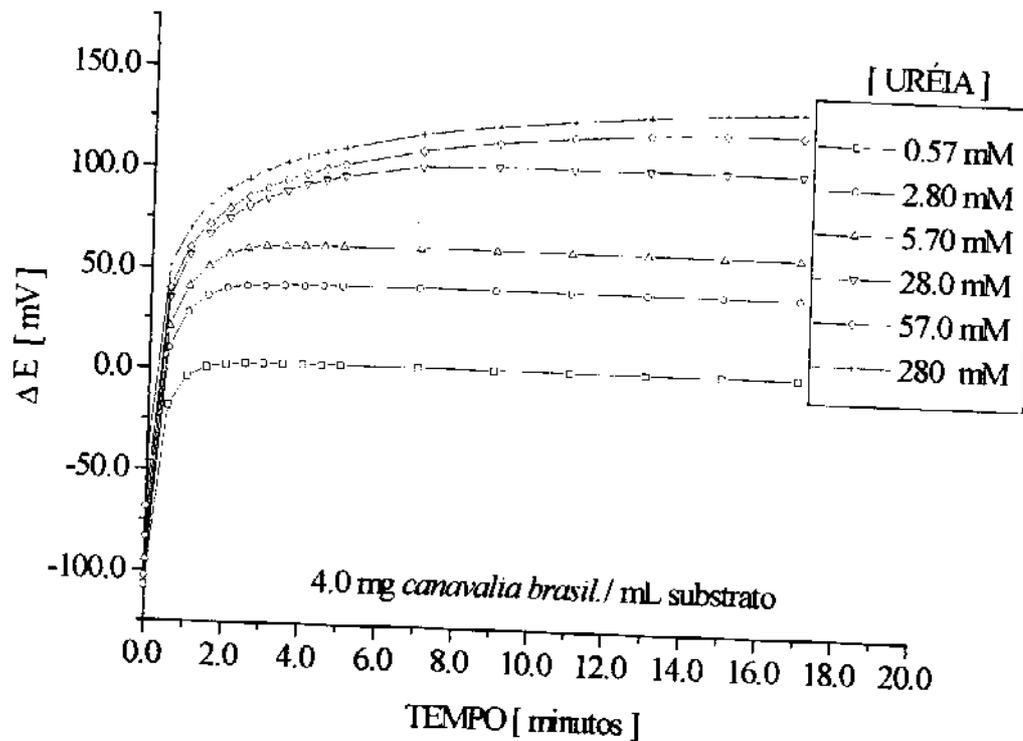


FIGURA II: Curvas de potencial versus tempo, usando-se 4,0 mg/mL de *canavalia brasiliensis*, em alíquotas de 10,0 mL de soluções de uréia em tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH = 6,8. T = 25,0 °C.

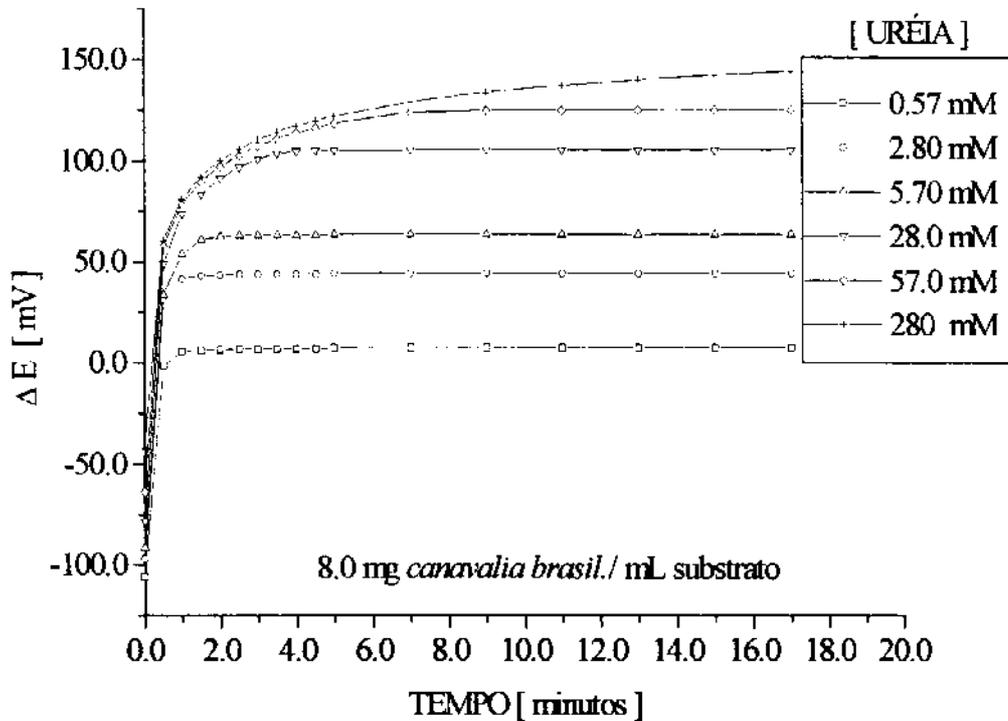


FIGURA III: Curvas de potencial versus tempo, usando-se 8,0 mg/mL de *canavalia brasiliensis*, em alíquotas de 10,0 mL de soluções de uréia em tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH = 6,8. T = 25,0 °C.

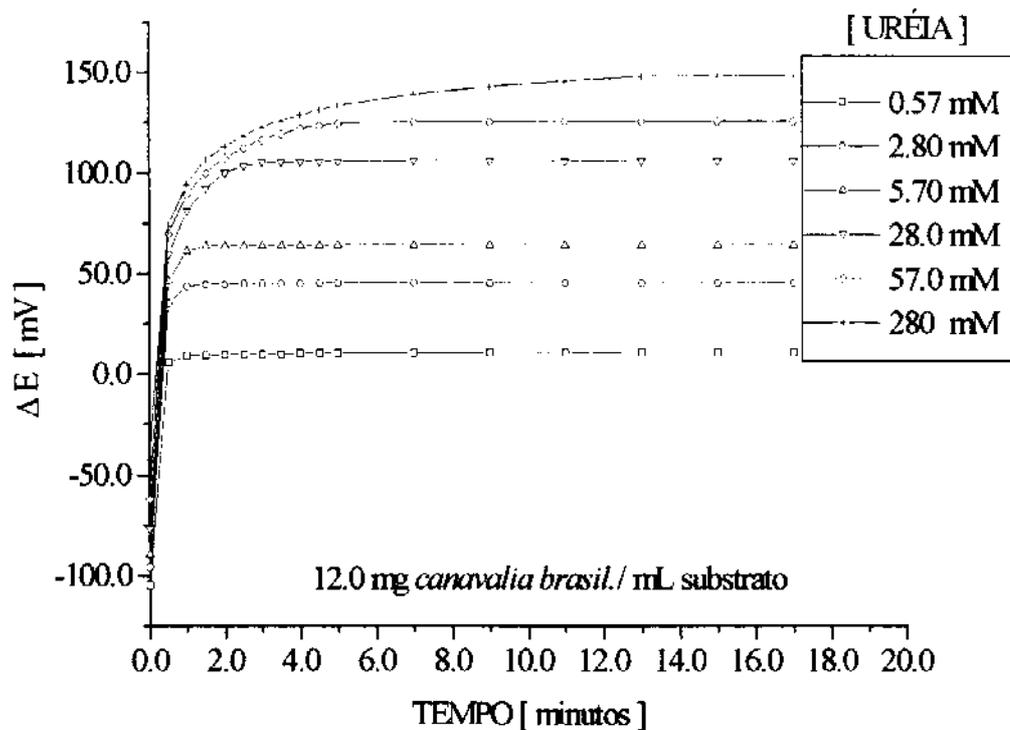


FIGURA IV: Curvas de potencial versus tempo, usando-se 12,0 mg/mL de *canavalia brasiliensis*, em alíquotas de 10,0 mL de soluções de uréia em tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH = 6,8. T = 25,0 °C.

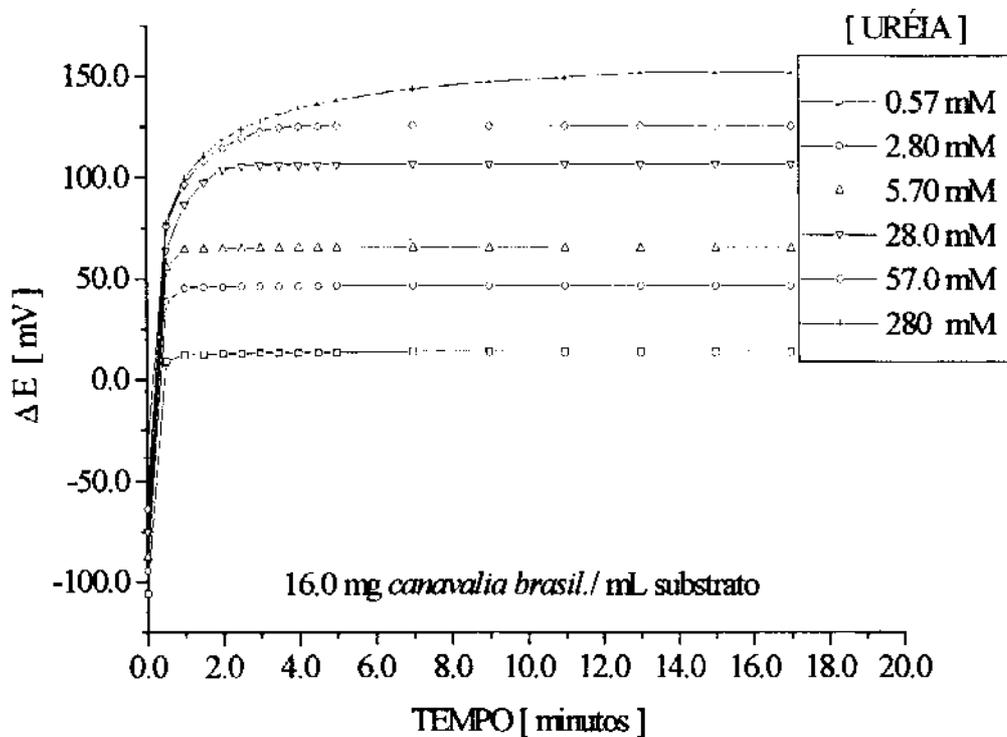


FIGURA V: Curvas de potencial versus tempo, usando-se 16,0 mg/mL de *canavalia brasiliensis*, em alíquotas de 10,0 mL de soluções de uréia em tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH = 6,8. T = 25,0°C.

O eletrodo apresenta um tempo de resposta de 5 minutos, quando se utiliza 12,0 mg do material em pó (suspensão) por mL de substrato, nas condições experimentais utilizadas. Observa-se uma estabilização no potencial após esse tempo, indicando que a velocidade reacional atingiu a condição de equilíbrio, sem a formação de mais produto, no caso, NH_4^+ .

3. DETERMINAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA ATIVIDADE DA UREASE

Os íons amônio formados na hidrólise enzimática de uréia, são monitorados pelo eletrodo íon-seletivo construído. Desta forma, é possível quantificar-se a atividade da urease na leguminosa *canavalia brasiliensis*, pela quantidade de produto formado, NH_4^+ , por unidade de tempo.

Convencionou-se que a atividade da urease estudada, ou uma unidade de atividade, U, seria a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1,0 μmol de amônio por minuto e por mg de material enzimático, nas condições experimentais utilizadas, a 25,0 °C e em tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH=6,8.

Inicialmente, construiu-se uma curva de calibração para cloreto de amônio na faixa de concentrações entre $5,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-1}$ M, nas mesmas condições acima citadas.

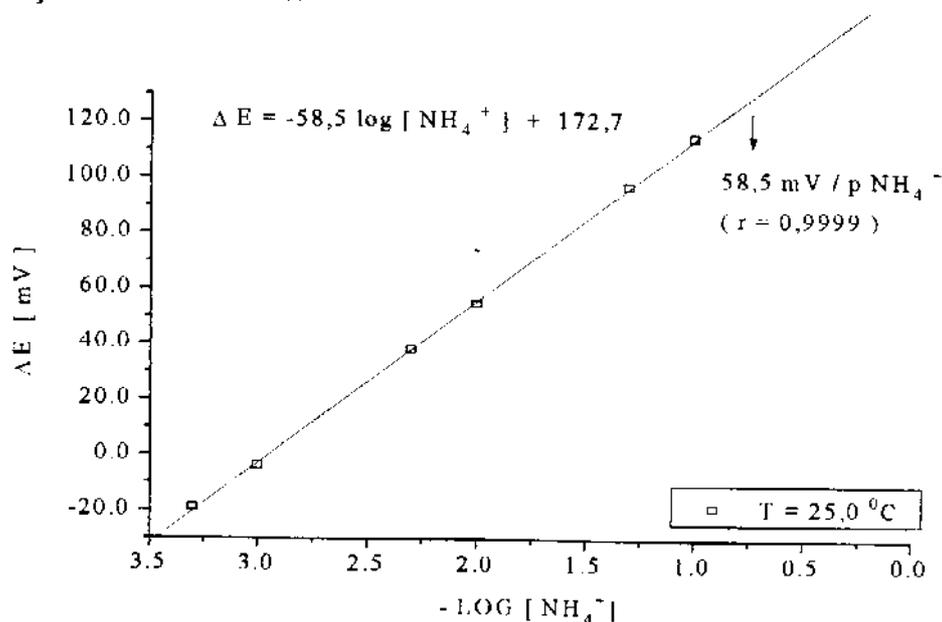


FIGURA VI: Curva de calibração para NH_4Cl - atividade potenciométrica da urease. Tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH = 6,8. Tempo de resposta do sensor base: 10 segundos.

Utilizando-se as curvas de potencial versus tempo, obtidas anteriormente, foi possível calcular a atividade da urease em diferentes concentrações de enzima e de substrato.

Para poder correlacionar o potencial obtido com a concentração logarítmica de amônio, os ensaios foram feitos nas mesmas condições experimentais e tomando-se como tempo fixo, para o cálculo da atividade, a porção da curva potencial versus tempo onde a cinética enzimática é de primeira ordem em relação ao substrato, ou seja, a parte linear das curvas hiperbólicas, assim obtidas. Foi tomado o tempo de 30 segundos para a correlação entre potencial e concentração de amônio, onde a reação não havia atingido ainda o estado de equilíbrio, para a qual a cinética de reação é, essencialmente, de ordem zero.

TABELA III: Dados de atividade enzimática obtidas para a urease - método potenciométrico. Uma unidade de atividade, 1U= 1,0 $\mu\text{mol NH}_4^+/\text{min.mg}$ pó leguminosa (*canavalia brasiliensis*).

QUANTIDADE LEGUMINOSA (mg)	[URÉIA] (mM)					
	0,57	2,80	5,70	28,0	57,0	280
40,0	0,27	0,85	1,25	2,20	2,65	4,15
80,0	0,25	0,93	1,05	1,95	2,75	3,00
120,0	0,23	0,73	1,15	2,00	2,83	3,33
160,0	0,20	0,64	1,23	1,75	2,75	2,88
média (\pm d.p.r.)	0,24 ($\pm 0,03$)	0,79 ($\pm 0,13$)	1,17 ($\pm 0,09$)	1,98 ($\pm 0,18$)	2,75 ($\pm 0,07$)	3,34 ($\pm 0,57$)

Observa-se uma concordância muito boa pelos valores obtidos de atividade enzimática, com desvios pequenos, exceção feita para concentração de uréia de 280 mM. Isto se deve pelo elevado teor de substrato que causa um efeito de saturação da enzima. Assim há uma diminuição na velocidade de resposta do eletrodo ion-seletivo, principalmente para baixas concentrações da enzima.

Comparando-se os valores de atividade da urease obtidos para diferentes fontes vegetais [58] com os dados calculados para *canavalia*

brasiliensis, fica evidenciado que esta última apresenta maior atividade comparativamente às outras estudadas, como é ilustrado na TABELA IV:

TABELA IV: Atividades enzimáticas para diferentes fontes de urease - método potenciométrico. 1U = 1,0 $\mu\text{mol NH}_4^+$ / min. mg material enzimático.

[URÉIA] (mM)	FONTE VEGETAL			
	urease pura*	<i>canavalia ensiformis</i>	<i>canavalia marítima</i>	<i>canavalia brasiliensis</i>
0,57	8,52	0,12	0,32	0,24
2,80	9,42	0,14	0,47	0,79
5,70	10,2	0,15	0,49	1,17
28,0	10,3	0,19	0,60	1,98
57,0	10,6	0,24	0,77	2,75
280	10,7	0,86	1,05	3,34

* urease obtida da Sigma, tipo II C, cat. n° U-8876 com 12000 U/g proteína.

3.1 Determinação de K_M e $v_{m\acute{a}x}$

Aproveitando os dados obtidos de atividade enzimática, para a leguminosa estudada, construiu-se um gráfico duplo recíproco Lineweaver-Burk, colocando-se dados do inverso da atividade obtida, velocidade reacional, versus o inverso da concentração de substrato, uréia, de acordo com a equação já mencionada no capítulo IV:

$$1/v_o = (K_M/v_{m\acute{a}x})1/[S] + 1/v_{m\acute{a}x}$$

Os valores de atividade enzimática foram expressos em unidades katal, recomendadas pela Enzyme Commission [38]. Assim, utilizou-se como uma unidade de atividade enzimática, a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1,0 μmol de NH_4^+ por segundo, nas condições usuais da determinação enzimática. Para tanto, apenas procedeu-se à transformação dos

valores obtidos, representados na TABELA III, nas unidades convenientes ao cálculo dos parâmetros bioquímicos.

Construindo-se os gráficos com os valores assim determinados, obtiveram-se K_M e $v_{m\acute{a}x}$ pelos interceptos com o eixo das ordenadas e o das abscissas, correspondendo, respectivamente, a $1/v_{m\acute{a}x}$ e $-1/K_M$.

Os valores calculados desta forma foram: $K_M = 5,48$ mM e $v_{m\acute{a}x} = 4,93$ μ katal, com coeficiente de correlação de 0,9976. A FIGURA VII, mostra a reta obtida experimentalmente.

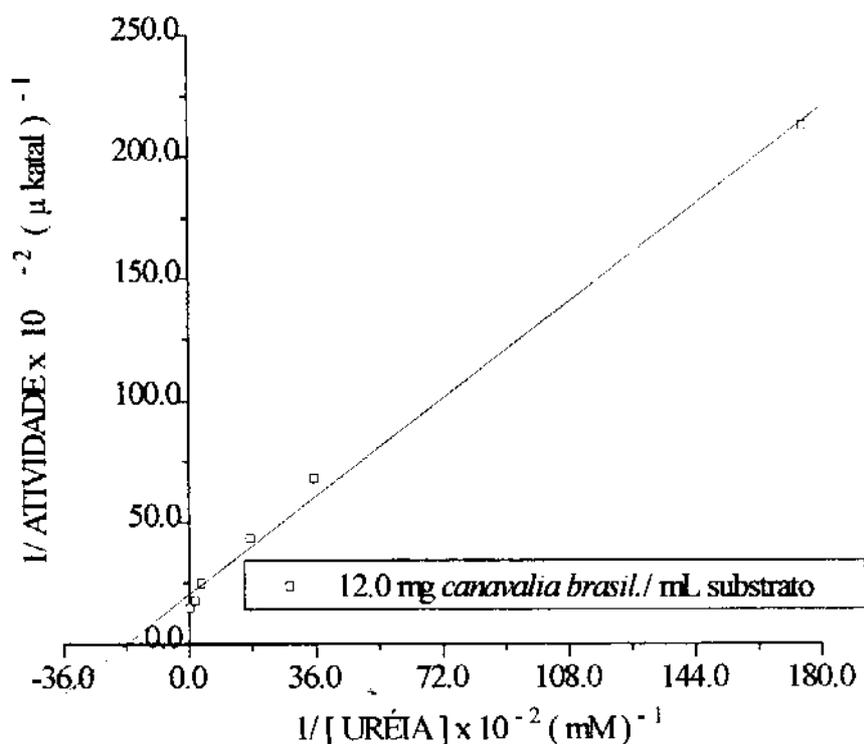


FIGURA VII: Curva $1/v_0$ versus $1/[S]$ - cálculo de K_M e $v_{m\acute{a}x}$.

Como a obtenção do valor de K_M depende das condições experimentais utilizadas como sistema tampão, pH, temperatura de reação entre outros, a comparação deste parâmetro bioquímico para a enzima em questão, urease, deve ser feita criteriosamente. O valor calculado para *canavalia marítima* em trabalho anterior [58], que foi de 2,80 mM, possui a mesma ordem de grandeza do valor obtido para *canavalia brasiliensis*, de 5,48 mM, além do fato de se usarem gêneros diferentes para as leguminosas estudadas, indicando elevada potencialidade enzimática para ambas, na reação com o substrato.

Assim, conclui-se que a utilização dessas leguminosas, em especial a *canavalia brasiliensis*, é perfeitamente viável na determinação enzimática de uréia, com um potencial catalítico muito bom verificado pelos valores de atividade obtidos.

Feita a caracterização do material enzimático, partiu-se para a última etapa do projeto, construindo-se o biossensor potenciométrico para uréia.

CAPÍTULO X

CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA URÉIA USANDO UREASE PROVENIENTE DE *CANAVALLIA BRASILIENSIS*

1. INTRODUÇÃO

No capítulo anterior, verificou-se que a leguminosa *canavalia brasiliensis* apresentou elevada atividade enzimática para urease, comparativamente às outras espécies estudadas previamente. Em vista deste fato, optou-se pelo uso desta fonte de enzima natural, para a construção do biossensor potenciométrico para uréia, aproveitando o eletrodo ion-seletivo a amônio desenvolvido para este fim.

O material enzimático, proveniente de *canavalia brasiliensis*, é convenientemente imobilizado com glutaraldeído sobre uma tela microporosa de nylon[®] a qual é acoplada à membrana do sensor base (contendo o ionóforo nonactin suportado em PVC) e segura por um anel de borracha (O-ring).

A solução de amostra, contendo uréia, difunde-se primeiramente pela membrana enzimática sofrendo hidrólise; os íons amônio, assim gerados no meio reacional, difundem-se até a membrana seletiva do sensor base, onde interagem com o ionóforo estabelecendo uma diferença de potencial na superfície da membrana, proporcional à concentração inicial de uréia.

A FIGURA 1, dada a seguir, mostra o esquema de funcionamento do biossensor potenciométrico:

solução com amostra	membrana enzimática	membrana do eletrodo ion-seletivo
<p>$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$</p> <p>tampão TRIS-HCL 0,2 M (pH=6,8)</p>	<p>$\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{E}$</p> <p>$\updownarrow$</p> <p>$\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{E}$</p> <p>$\updownarrow$</p> <p>$\text{HCO}_3^- + \text{NH}_4^+$</p> <p>E = <i>canavalia brasiliensis</i></p>	<p>I = ionóforo nonactin suportado em PVC</p> <p>$\text{NH}_4^+ + \text{I} \xrightleftharpoons{\Delta E} [\text{NH}_4\text{I}]^+$</p>

FIGURA I: Esquema do biossensor potenciométrico para uréia.

As membranas enzimáticas foram confeccionadas, otimizando-se as condições experimentais de maneira a obter-se a melhor resposta analítica na determinação de uréia.

Com a intenção de minimizarem-se interferências devidas a alguns cátions mais comuns na resposta do biossensor, foi feito um estudo com Nafion[®] [69]. Nafion é um polímero de troca iônica perfluorinado-sulfonado em mistura de álcoois alifáticos, fabricado pela DU-PONT a 5 % (m/v), que pré-concentra cátions seletivamente, reduzindo possíveis interferências. É altamente estável química e termodinamicamente em solução aquosa.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais e Reagentes

Utilizou-se Nafion da Aldrich a 5 % (m/v) em mistura de álcoois alifáticos (10 % água); para diluições, usou-se etanol puro. Para as curvas de calibração típicas usou-se uréia de pureza analítica.

Todas as soluções aquosas foram feitas em tampão TRIS-HCL 0,2 M - pH = 6,8, contendo o quelante EDTA a 1,0 mM; as medidas de potenciais foram efetuadas com as soluções à temperatura de 30,0°C.

Para a imobilização do material enzimático, prepararam-se soluções de glutaraldeído a 12,5 % (v/v) e glicina 0,1 M.

A aparelhagem empregada nesta etapa do projeto foi a mesma usada na avaliação do sensor base: pH/Analisador de íons ($\pm 0,1$ mV), sensor de temperatura ($\pm 0,1$ °C) e um eletrodo de referência de Ag//AgCl, KCl 4 M sat. com AgCl//Ca(NO₃)₂ 1 M, dupla junção, todos da marca Radelkis. Utilizou-se também um banho de termostatização Colora tipo KT 10K.

2.2 Confeção da membrana biossensora

O pó do material bioativo, obtido de *canavalia brasiliensis* através da simples remoção da casca das sementes e posterior trituração, foi passado em peneira de malha 80.

Adicionou-se 40,0 mg da leguminosa assim tratada, sobre uma tela de nylon microporosa, misturando em seguida 20,0 μ L de solução de glutaraldeído a 12,5 % (v/v) e 20,0 μ L de tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH = 6,8 - com posterior homogeneização.

A mistura resultante foi seca ao ambiente (T = 25,0 °C) por 20 minutos, permanecendo por mais 15 minutos, separadamente, em: água deionizada, solução de glicina 0,1 M e tampão TRIS-HCl, respectivamente.

A membrana assim obtida, quando fora de uso, foi acondicionada sob refrigeração , entre 2 e 4 °C. Após o condicionamento da membrana por 24 horas, obtiveram-se as curvas de calibração para uréia na faixa de concentrações entre 10⁻⁶ e 10⁻¹ M, verificando o desempenho analítico do biossensor.

2.3 Utilização de Nafion

Sobre a membrana biossensora, com a leguminosa já imobilizada com glutaraldeído, foram adicionados 500 μ L de solução de Nafion (testou-se a membrana para três concentrações do produto: 1,0 - 2,5 e 5,0 %). Deixou-se a membrana secar ao ambiente por uma hora.

Para cada membrana com camada de Nafion, obtiveram-se curvas de calibração para uréia (10⁻⁶ - 10⁻¹ M) com e sem potássio agindo como principal íon interferente em concentração fixa de 10³ M.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES: AVALIAÇÃO ANALÍTICA DO BIOSENSOR

3.1 Parâmetros de calibração

Para verificar a faixa operacional de trabalho do biossensor assim construído (resposta nernstiana), obtiveram-se as curvas de calibração típicas em soluções de uréia com a força iônica ajustada a 0,2 M em tampão TRIS-HCl pH = 6,8.

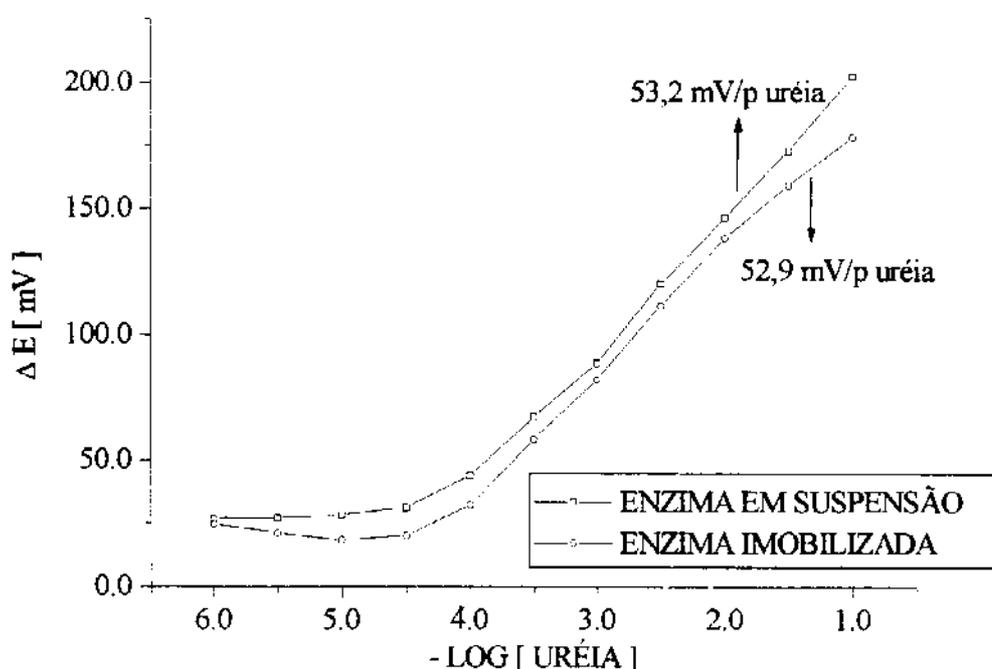


FIGURA II: Curvas de calibração para uréia ($T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$), obtidas com o material enzimático sob duas formas:

- em suspensão (5,0 mg de leguminosa / mL de substrato);
- imobilizado quimicamente (40,0 mg de leguminosa / 20,0 μL glutaraldeído a 12,5 % (v/v)).

Verificou-se que a leguminosa usada em suspensão apresentou resposta linear na faixa de concentrações de uréia entre $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-1}$ M, com coeficiente angular de Nernst de 53,2 mV/ década de concentração com boa correlação ($r = 0,9989$) e potenciais bastante estáveis e reprodutíveis.

Com a imobilização do material catalítico, a faixa de concentração de uréia, que apresentou resposta nernstiana, foi diminuída em aproximadamente

uma década de concentração: $1,1 \times 10^{-4}$ a $1,6 \times 10^{-2}$ M, com coeficiente angular nernstiano de 52,9 mV/ década de concentração e correlação de 0,9995.

Isto se deve naturalmente ao próprio processo de imobilização química, onde parte da atividade da urease é perdida devido às ligações covalentes entre a estrutura enzimática e o agente de imobilização, porém, com a vantagem de poder-se reutilizar a membrana com reprodutibilidade analítica considerável.

É interessante notar que para concentrações mais elevadas de substrato, a resposta do biossensor é muito lenta, pois atinge-se o estado de saturação da enzima imobilizada, dificultando a etapa subsequente de formação de produtos pela reação enzimática.

Conclui-se que é possível usar a leguminosa *canavalia brasiliensis* sob as duas formas, em suspensão ou imobilizada, dependendo das necessidades em se quantificar a uréia, principalmente no aspecto da frequência de amostragem (número de amostras por tempo). Para frequências elevadas, é preferível utilizar a enzima na forma imobilizada, devido à facilidade de reutilização, diminuindo consideravelmente o tempo de análise, além de diminuir o nível de interferentes pelo fato da enzima estar em um ambiente muito semelhante ao encontrado na natureza.

3.2 Tempo de resposta

Através das curvas de potencial versus tempo, já apresentadas no capítulo anterior, verificou-se que o tempo de resposta para a enzima utilizada em suspensão foi de 5 minutos, monitorando-se a quantidade de íons amônio formados na hidrólise da uréia. O uso de 12,0 mg do material enzimático por mL de substrato, foi suficiente para a estabilização do potencial, após 5 minutos, nas condições experimentais usadas e para uma faixa de concentrações de uréia entre 0,57 e 57,0 mM.

Já utilizando-se o material ativo imobilizado com glutaraldeído, verificou-se que o tempo necessário à estabilização do potencial, após variar-se novamente em um década de concentração o nível de uréia, situava-se na faixa entre 9 e 10 minutos, no mesmo intervalo de concentração de substrato usado para a enzima livre.

Este aumento de aproximadamente 100 % no tempo de resposta em relação à enzima em suspensão, deve-se a três fatores principais:

- 1) diminuição da atividade catalítica durante a imobilização por ligação covalente cruzada;

2) diminuição da área superficial do material enzimático, em pó, em contato com a solução de uréia;

3) diminuição na velocidade de difusão de produto formado, NH_4^+ , até a membrana do eletrodo íon-seletivo.

3.3 Membrana biossensora

Os principais fatores responsáveis pela otimização da resposta analítica do biossensor estão relacionados diretamente com a confecção da membrana enzimática, ou seja, o tipo de imobilização utilizado em sua preparação e a espessura da camada contendo o material ativo, assim produzida.

Sem dúvida, a quantidade de agente de imobilização, glutaraldeído, influi diretamente no desempenho do biossensor. Quantidades elevadas desse agente imobilizante podem reduzir a capacidade catalítica da enzima, alterando quimicamente os sítios ativos da mesma, ainda mais quando se utilizam fontes naturais para tal fim, onde o teor enzimático é menor em relação à enzima em sua forma pura. Baixas concentrações de glutaraldeído podem não produzir o efeito desejado, permanecendo grande parte da enzima parcialmente ou não imobilizada.

Estudos extensivos neste sentido tem sido realizados, [47], [58] e [59], para melhorar o desempenho analítico de biossensores em geral. Desta forma, é verificado que o uso de soluções diluídas de glutaraldeído, usualmente 12,5 ou 25 %, são preferíveis no processo de imobilização, pois favorecem consideravelmente a reação entre os grupos amino da estrutura enzimática e os grupos aldeídicos do glutaraldeído, devido às estruturas multiméricas presentes.

A espessura da membrana está relacionada diretamente com a velocidade de difusão de produto formado pela reação enzimática até o sensor base, bem como a velocidade de agitação da solução que deve permanecer constante, durante a análise. É interessante obter-se membranas as mais finas possíveis, pois o tempo de resposta é reduzido também e de forma apreciável.

Contudo, existe uma quantidade crítica de material enzimático abaixo da qual a determinação analítica torna-se inviável por este método.

Neste trabalho, a espessura da membrana enzimática preparada na determinação de uréia foi medida, com precisão de $\pm 0,01$ mm, apresentando um valor de 1,21 mm, quando se utilizou 40,0 mg de *canavalia brasiliensis*, em pó, onde o biossensor apresentou resposta nernstiana na faixa de concentrações de uréia entre $1,1 \times 10^{-4}$ e $1,6 \times 10^{-2}$ M (52,9 mV/ década de concentração) e tempo de resposta de 10 minutos, a 30,0 °C.

Procurou-se utilizar toda a superfície da membrana do sensor base em contato com a membrana enzimática, para melhorar a resposta do biossensor .

3.4 Influência do uso de Nafion na membrana biossensora [69]

A FIGURA III, adiante, ilustra como a aplicação de Nafion reduz em parte a interferência devido a íons potássio, K^+ , na resposta do biossensor.

Pelos dados obtidos, observa-se uma diferença apreciável entre as curvas de calibração obtidas para uréia com e sem K^+ como principal agente interferente.

O grupo hidrofílico sulfonato, carregado negativamente no Nafion, torna-o capaz de pré-concentrar cátions por interação eletrostática. O grupo hidrofóbico flúor-carbono, apresenta elevada seletividade iônica para cátions orgânicos, por interação hidrofóbica. Assim, é possível eliminar-se algumas interferências ou pelo menos reduzi-las, pela aplicação de Nafion sobre a superfície da membrana biossensora.

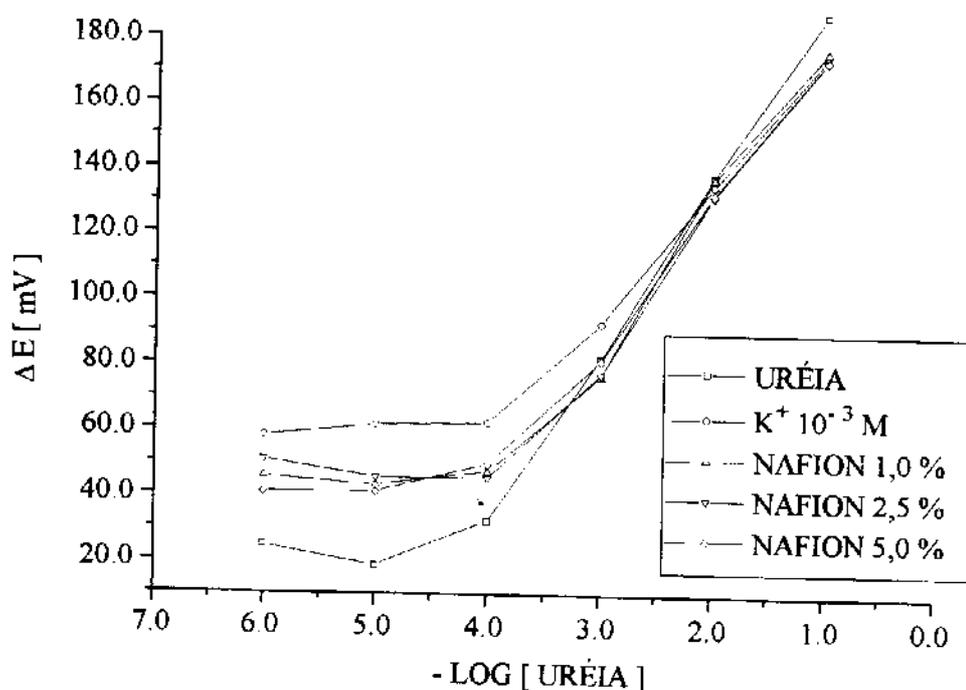


FIGURA III: Curvas de calibração obtidas para uréia, com e sem K^+ interferindo ($10^{-3} M$); verificação da diminuição deste interferente pela adição de Nafion à membrana biossensora, em diferentes concentrações. Tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH = 6,8 (T = 30,0 °C).

As membranas com camada de Nafion exibiram uma ligeira diminuição na interferência devido a este íon, mas não de forma integral. Mesmo utilizando-se concentrações diferentes desse polímero de troca iônica (mais elevadas), não houve redução apreciável na interferência de íons potássio.

Para níveis menores de interferência, esse procedimento mostra-se útil, podendo ser usado devido a sua simplicidade e baixo custo, desde que se observe baixas concentrações de interferência, em amostras a serem analisadas por este método.

3.5 Tempo de Vida

Curvas de calibração semanais foram obtidas para a membrana biossensora, com soluções de uréia na faixa de concentrações entre 10^{-4} e 10^{-2} M, em tampão TRIS-HCl 0,2 M, verificando o coeficiente angular nernstiano como parâmetro comparativo do desempenho analítico do biossensor.

Para todas as membranas preparadas, o tempo de vida útil das mesmas não ultrapassou 8 semanas, mesmo quando acondicionadas sob refrigeração ($4,0\text{ }^{\circ}\text{C}$) e na solução tampão usada, para evitar-se ressecamento. Decorrido este período, as membranas não apresentavam atividade catalítica alguma frente ao substrato, verificada pelo eletrodo base, com potenciais instáveis e pouco reprodutíveis.

Os resultados obtidos para o biossensor potenciométrico para uréia são bons quando comparados com outros biossensores [35] para este substrato - TABELA I - mas que se utilizam da enzima, urease, com atividades enzimáticas mais elevadas (enzima purificada).

TABELA I: Principais características analíticas para biossensores potenciométricos para uréia.

SENSOR USADO	TIPO DE * IMOBILIZ.	ESTABILIDADE OPERACIONAL	TEMPO DE RESPOSTA	U **	FAIXA LI-NEAR(mM)
NH ₄ ⁺	física	3 semanas	30-60 s	75	0,05-10,0
NH ₄ ⁺	física	2 semanas	1-2 min	25	0,10-10,0
NH ₄ ⁺	química	> 4 meses	1-2 min	10	0,10-10,0
pH	física	3 semanas	5-10 min	100	0,05-5,0
NH ₃	química	> 4 meses	2-4 min	10	0,05-50,0
NH ₃	química	20 dias	1-4 min	0,5	0,10-10,0
CO ₂	física	3 semanas	1-2 min	25	0,10-10,0

* imobilização física: oclusão em gel de poliacrilamida;
 imobilização química: reação com glutaraldeído.

** U = unidades de enzima por mg de proteína.

Pelos valores assim comparados, nota-se a maior estabilidade de biossensores preparados a partir de imobilização química, com tempos de resposta relativamente baixos e faixas de concentração para uréia (com resposta nemstiana) mais amplas. Pelo fato de se utilizar no presente trabalho uma fonte natural de enzima, conclui-se que o tempo de vida útil para o biossensor preparado é muito bom, em relação à maioria dos biossensores que se utilizam da enzima em sua forma pura, na maior parte dos casos.

4. DETERMINAÇÃO DE URÉIA EM AMOSTRA COMERCIAL

4.1 Método potenciométrico usando biossensor construído

Otimizados os parâmetros analíticos mais importantes na determinação enzimática de uréia, verificou-se o desempenho do biossensor potenciométrico para amostra real deste substrato.

A uréia, obtida para análise, é fabricada pela Cia. Nitrofértil S/A, com as seguintes especificações: porcentagem de uréia livre - 95,0 a 97,0 % de pureza - teor de nitrogênio total disponível - 45,0 % . Esta uréia é comercializada principalmente como agente fertilizante e como fonte de nitrogênio para ração animal.

Inicialmente, construiu-se uma curva de calibração para uréia na faixa de concentrações onde o biossensor exibiu resposta linear, usando a enzima na forma imobilizada proveniente de *canavalia brasiliensis* .

A FIGURA IV, dada a seguir, mostra o desempenho do biossensor potenciométrico com os parâmetros estatísticos devidamente calculados.

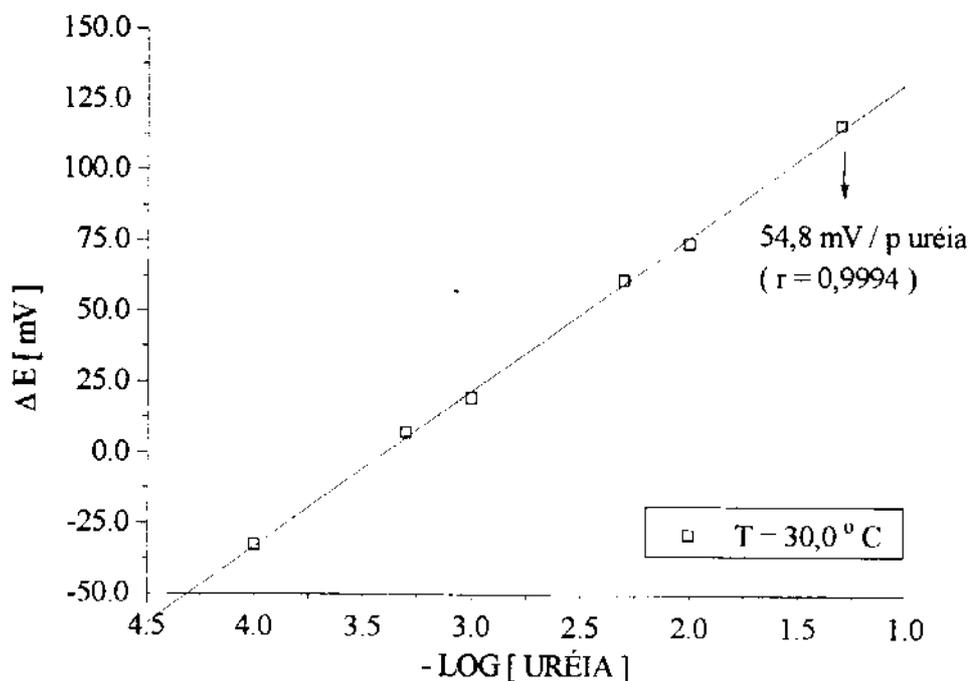


FIGURA IV: Curva de calibração típica para uréia em tampão TRIS-HCl 0,2 M - pH = 6,8. Uréia: $1,0 \times 10^{-4}$ - $5,0 \times 10^{-2}$ M. Tempo de resposta do biossensor: 10 minutos.

Em seguida, prepararam-se baterias de soluções com amostras de uréia comercial, nas mesmas condições experimentais obtidas para a curva de calibração, em concentrações de 1,0 e 5,0 mM, obtendo-se as diferenças de potencial apropriadamente.

A equação obtida para a curva, a 30,0 °C, e usada para correlacionar potencial e concentração logarítmica de uréia, é dada por:

$$\Delta E = -54,8 \log [\text{uréia}] + 186,3 \quad \{1\}$$

As tabelas, dadas a seguir, resumem os valores obtidos experimentalmente para amostra real de uréia, correlacionando a diferença de potencial, concentração de uréia (obtida pela equação {1}) e porcentagem de pureza em relação à amostra comercial.

TABELA II: Dados obtidos para amostra real de uréia em concentração de 1,0 mM.

AMOSTRA	ΔE (mV)	[URÉIA] (mM)	% PUREZA
1	20,8	0,958	95,8
2	20,9	0,962	96,2
3	20,8	0,957	95,7

TABELA III: Dados obtidos para amostra real de uréia em concentração de 5,0 mM.

AMOSTRA	ΔE (mV)	[URÉIA] (mM)	% PUREZA
1	59,1	4,79	95,7
2	59,3	4,81	96,3
3	59,2	4,80	95,9

A média dos valores de porcentagem de pureza calculados, com a respectiva estimativa do desvio padrão é de (95,9 \pm 0,3) % . Este procedimento para determinação de uréia mostra resultados muito bons verificados pelos dados assim obtidos. O valor médio do teor de uréia

encontrado, está próximo do valor especificado para o produto, com boa precisão nas medidas.

4.2 Método espectrofotométrico usando reagente de Nessler

Assumindo a ausência de erros determinados ou sistemáticos na determinação de uréia, deve-se ressaltar a possível presença de erros indeterminados na análise, flutuando de modo aleatório.

Assim, para avaliar-se a exatidão do procedimento utilizado neste trabalho, é interessante empregar-se um método de referência que já tenha sido extensamente estudado, para comparar-se os resultados obtidos para amostra comercial de uréia.

Neste sentido, utilizou-se o reagente de Nessler [12] para a determinação espectrofotométrica de uréia, através da amônia liberada na hidrólise enzimática deste substrato. Este método, já citado no Capítulo II, é largamente empregado na quantificação de amônia em soluções diluídas, da ordem de 0,1 mg/L.

4.2.1 Procedimento experimental

Inicialmente, construiu-se uma curva de calibração para soluções de uréia em EDTA a 1,0 % (pH=6,5), na faixa de concentrações entre $1,0 \times 10^{-4}$ e $2,5 \times 10^{-2}$ M da seguinte forma: transferiram-se alíquotas de 1,0 mL de soluções de uréia em tubos de ensaio contendo 2,0 mL de água destilada e 120,0 mg de *canavalia brasiliensis* em pó, passada em peneira de malha 80; em seguida, foram agitadas e colocadas em banho termostatizado a 30,0 °C por 5 minutos.

Para o desenvolvimento do composto colorido, transferiu-se 1,0 mL da amostra incubada para novos tubos de ensaio, adicionando-se 15,0 mL de água destilada e 1,0 mL do reagente de Nessler recém-preparado de acordo com a referência [12]. Após agitação, as soluções foram colocadas novamente em banho termostatizado a 25,0 °C por mais 5 minutos.

As leituras de absorbâncias foram lidas em cubetas de polietileno de 1,0 cm de caminho óptico, usando um espectrofotômetro MICRONAL modelo B-382 devidamente zerado com um branco reagente, em comprimento de onda máximo de 436 nm.

A FIGURA V, a seguir, mostra os resultados obtidos experimentalmente:

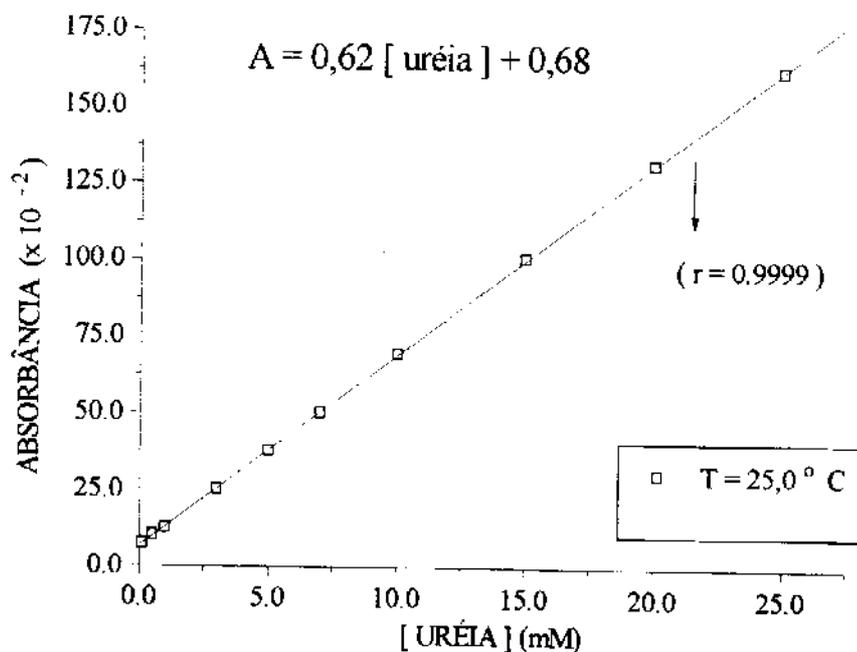


FIGURA V: Curva de calibração para uréia em EDTA 1,0 % (pH=6,5). Método espectrofotométrico utilizando reagente de Nessler ($\lambda_{\text{máx.}} = 436 \text{ nm}$).

Em seguida, prepararam-se soluções com amostras de uréia comercial, nas mesmas condições descritas anteriormente, em concentrações de 10,0 mM, obtendo-se as leituras de absorbâncias apropriadamente (triplicata).

A TABELA IV, fornece os valores medidos correlacionando absorbância, concentração de uréia e porcentagem de pureza em relação à amostra analisada:

TABELA IV: Dados obtidos espectrofotometricamente para amostras de uréia em concentração de 10,0 mM.

AMOSTRA	ABSORBÂNCIA LIDA	[URÉIA] (mM)	% PUREZA CALCULADA
1	0,663	9,56	95,6
2	0,667	9,63	96,3
3	0,665	9,61	96,1

O valor médio calculado de (96,1 ± 0,4)% em uréia, está próximo do valor obtido no método potenciométrico desenvolvido, com uma concordância muito boa dos resultados, expressa pela estimativa dos desvios-padrão, indicando que o método pode ser empregado como alternativa na determinação enzimática de uréia.

Em ambos os métodos usados na quantificação do teor de uréia na amostra analisada, obtiveram-se valores dentro da faixa de pureza deste produto, especificada em sua embalagem.

Os valores de estimativa do desvio padrão relativos, obtidos neste trabalho, foram calculados pela expressão {2}, adiante, levando-se em conta o pequeno número de determinações realizadas para o cálculo de parâmetros estatísticos [70].

$$s = \sqrt{\sum (X_i - X)^2 / (N - 1)} \quad , \text{ onde: } \quad \{2\}$$

s = estimativa do desvio padrão relativo;

X_i = valor medido;

X = média aritmética das medidas e

N = número de medidas feitas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Fica evidenciado, pelo estudo das atividades das leguminosas, que a espécie *canavalia brasiliensis* apresenta maiores potencialidades analíticas na determinação enzimática de uréia. Evidentemente, a enzima em sua forma purificada é mais indicada, porém, é possível utilizar esta fonte vegetal de urease diretamente por simples maceração das sementes.

As condições experimentais utilizadas, tanto para a enzima em suspensão quanto para a enzima imobilizada, foram basicamente as mesmas: tampão TRIS-HCl com força iônica ajustada a 0,2 M, pH da solução = 6,8 e temperatura de 30,0 °C. Somente o tempo de resposta para a enzima imobilizada aumentou em relação à enzima livre, entre 9 e 10 minutos, pelo próprio processo de imobilização, o que não inviabilizou a metodologia. As principais vantagens deste processo são: a reutilização da membrana preparada e maior estabilidade do material catalítico, frente à imobilização com glutaraldeído, pois a enzima fica protegida como se estivesse em seu ambiente natural.

A membrana enzimática preparada, armazenada sob refrigeração, permitiu sua reutilização durante aproximadamente dois meses, tempo no qual o biossensor potenciométrico para uréia exibiu desempenho analítico considerável, permitindo um número elevado de determinações analíticas.

A aplicação prática do biossensor em amostra comercial de uréia, mostra que a fonte natural de urease é uma alternativa viável para a enzima pura, inclusive podendo suprir a falta do produto em alguns casos.

Finalmente, mostrou-se que o biossensor potenciométrico desenvolvido para uréia, bem como o sensor base para íons amônio, são adequados para o desenvolvimento de métodos relativamente rápidos, simples e baratos, quando comparados com outros já descritos.

Em vista dos resultados obtidos, tem-se como perspectiva de trabalhos futuros, a automação deste método, usando reator enzimático, com a incorporação da leguminosa "in natura" em sistemas por injeção em fluxo, o que eliminaria grande parte da interferência analítica. A determinação poderá ser realizada potenciometricamente com o eletrodo utilizado neste trabalho, ou condutometricamente.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Moody,G.J. ; Thomas,J.D.R. ; Analyst ; 113: 497 (1988).
- [2] Morf,W.E. ; “Studies in Analytical Chemistry - 2”
Elsevier Pub. Co., N. York, Cap. XII (1981).
- [3] Pranita,D.M. ; Diaz,M.T. ; Meyerhoff,M.E. ; Critical Rev. in Anal. Chem.
; 23 (3): 163 (1992).
- [4] Della Vida,B.L. ; Lombardi,L. ; Diag. Med. ; 8: 247 (1963).
- [5] Van Slyke,D.D. ; Hiller,A. ; J. Biol. Chim. ; 102: 499 (1933).
- [6] Conway,E.J. ; “Microdiffusion Analysis and Volumetric Error”
Ed. Crosby Leuckwood, 4.^a ed., pág. 163 (1957).
- [7] Fosse,R. ; Robyn,A. ; François,F. ; Compt. Rend. Acad. ; 159: 367 (1914).
- [8] Bonitz,K. ; Führ,J. ; Ser. Gegenwart ; 3: 102 (1963).
- [9] Fearon,W.R. ; Biochem. J. ; 33: 902 (1939).
- [10] Neves,G.V. ; Pike,R.L. ; Analyst Biochem. ; 2: 174 (1961).
- [11] Hanss,M. ; Rey,A. ; Biochem. Biophys. Acta ; 227: 630 (1971).
- [12] Vogel,A.I. ; “Análise Inorgânica Quantitativa”
Ed. Guanabara; 4.^a ed.; Rio de Janeiro; pág. 543 (1981).
- [13] Berthelot,M. ; Repert. Chim. Appl. ; 1: 284 (1859).
- [14] Chaney,A.L. ; Marbach,E.P. ; Clin. Chem. ; 8: 130 (1960).
- [15] Guilbault,G.G. ; Hrabankova,E. ; Ann. Biol. Chim. ; 52: 287 (1970).
- [16] Guilbault,G.G. ; Nagy,G. ; Kuan,S.S. ; Anal. Chim. Acta ; 67: 195 (1973).
- [17] Mascini,M. ; Guilbault,G.G. ; Anal. Chem. ; 49: 795 (1977).
- [18] Booker,H. ; Haslan, J. ; Anal. Chem. ; 46: 1054 (1974).

- [19] Folin, O. ; J. Biol. Chem. ; 14: 283 (1913).
- [20] IUPAC - Commission on Analytical Nomenclature ; Pure Appl. Chem. ; 48: 127 (1976).
- [21] IUPAC - Commission on Electroanalytical Chemistry; Pure Appl. Chem. ; 65: 8 (1993).
- [22] Luther, R. ; Z. Phys. Chem. ; 27: 364 (1898).
- [23] Dearden, J.C. ; George, E. ; Pharm. Acta Helv. ; 54: 347 (1979).
- [24] Bailey, P.L. “Analysis with ion-selective electrodes”
Heyden & Son Ltd., 2.^a ed. (1980).
- [25] Nicolsky, B.P. ; Acta Physiochim. ; 7: 597 (1937).
- [26] Moody, G.J. ; Thomas, J.D.R. ; Talanta ; 18: 1251 (1971).
- [27] Moody, G.J. ; Thomas, J.D.R. ; Analyst ; 95: 910 (1970).
- [28] Orion Research Inc. ; Newsletter ; 1: 29 (1969).
- [29] Blum, E. ; Lengyel, B. ; Trans. Faraday Soc. ; 30: 461 (1934).
- [30] Frant, M.S. ; Ross, J.W. ; Science ; 154: 3756 (1966).
- [31] Bailey, P.L. ; Riley, M. ; Analyst ; 100: 145 (1975).
- [32] Katz, S.A. ; Rechnitz, G.A. ; Z. Anal. Chem. ; 196: 248 (1963).
- [33] Gavach, C. ; Seta, P. ; Anal. Chim. Acta ; 50: 407 (1970).
- [34] Gavach, C. ; Bertrand, C. ; Anal. Chim. Acta ; 55: 385 (1971).
- [35] Guilbault, G.G. ; “Analytical Uses of Immobilized Enzymes”
Marcel Dekker Inc., N. York (1984).
- [36] Liebig, J.V. ; Wöhler, F. ; Ann. Chem. ; 22: 1 (1837).
- [37] Laskin, A.I. “Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology”
Cummings Pub. Inc., London, Cap. X (1985).

- [38] Lehninger,A.L. ; “Bioquímica”
Ed. Edgard Blücher, 2.^a ed., Vol. 1, Cap. VIII (1993).
- [39] Baum,P. ; Czok,R. ; Biochem. Z. ; 332: 121 (1959).
- [40] Boyer,P.D. ; “The Enzymes”
Acad. Press, Vol. 2, pág. 35, N. York (1970).
- [41] Ogren,L. ; Johansson,G. ; Anal. Chim. Acta ; 96: 1 (1978).
- [42] Nelson,J.M. ; Griffin,E.J. ; J. Am. Chem. Soc. ; 297: 1109 (1916).
- [43] Chang,T.M.S. ; Biochem. Biophys. Res. Commun. ; 4: 1531 (1961).
- [44] Vorobeva,E.S. ; Pollorak,O.M. ; Vestn. Mosk. Univ. Khim.; 21:17(1986).
- [45] Imman,D.J. ; Hornby,W.E. ; Biochem. J. ; 129: 255 (1972).
- [46] Scouten,W.H. “Solid Phase Biochemistry”
John Wiley & Sons; N. York; Vol. 66; pág.260 (1983).
- [47] Walt,D.R. ; Agayn,V.I. ; Trends in Anal. Chem. ; 13 (10): 425 (1994).
- [48] Sumner,J.B. ; J. Biol. Chem. ; 69: 435 (1926).
- [49] Marshal,E.K. ; J. Biol. Chem. ; 15: 487 (1913).
- [50] Machado,M. ; Rev. Ass. Med. Bras. ; 4: 3 (1958).
- [51] Gorin,G. ; Biochemistry ; 1: 911 (1962).
- [52] Kistaiakowsky,G.B. ; Shaw,W.H.R. ; J. Am. Chem. Soc.; 75: 2751 (1953).
- [53] Fasman,G. ; Nieman,G. ; J. Am. Chem. Soc. ; 73: 1646 (1951).
- [54] Ratellif,N.M. ; Anal. Chim. Acta ; 239: 257 (1990).
- [55] Clark,L. ; Lyons,C. ; Ann. N. Y. Acad. Science ; 102: 29 (1962).
- [56] Nothenberg,M. ; Rev. Quím. e Derivados ; AGOSTO-1994 ; pag. 34.

- [57] Guilbault, G.G. ; Montaivo, G.G. ; J. Am. Chem. Soc. ; 91: 2164 (1969).
- [58] Neto, G.O. ; Godinho, O.E.S. ; Aleixo, L.M. ; Silva, V.L. ; Electroanalysis ; 6: 593 (1994).
- [59] Deng, J. ; Fang, Y. ; Cai, R. ; Electroanalysis ; 3: 767 (1991).
- [60] Adeloju, S.B. ; Shaw, S.J. ; Wallace, G.G. ; Anal. Chim. Acta ; 281: 611 (1993).
- [61] Fabregas, E.M. ; Alegret, S. ; J. of Chem. Educ. ; 71(3): A67 (1994).
- [62] Kawabata, Y. ; Sugamoto, H. ; Imasaka, T. ; Anal. Chim. Acta ; 283: 689 (1993).
- [63] Stamm, C. ; Seiler, K. ; Simon, W. ; Anal. Chim. Acta ; 282: 229 (1993).
- [64] Faria, L.C. ; Pasquini, C. ; Neto, G.O. ; Analyst ; 116: 357 (1991).
- [65] Beer, D. ; Van den Heuvel, J.C. ; Talanta ; 35(9): 728 (1988).
- [66] Joseph, J.P. ; Mikrochim. Acta ; 2(5-6): 473 (1984).
- [67] Lima, J.L.F.C. ; Lapa, R.A.S. ; Silva, A.M.R. ; Il Farmaco ; 45: 901 (1990).
- [68] Simon, W. ; Bühner, T. ; Peter, H. ; Europ. J. of Physiol. ; 412: 359 (1988).
- [69] Zhou, J. ; Wang, E. ; Anal. Chim. Acta ; 249: 489 (1991).
- [70] Andrade, J.C. ; Baccan, N. ; Godinho, O.E.S. ; Barone, J.S. ;
“Química Analítica Quantitativa Elementar”
Ed. Edgard Blücher, 2.^a ed., Cap. I (1985).